



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



 **iata**
Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

*EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN DE *Caenorhabditis elegans* POR *Salmonella typhimurium* MEDIANTE LA ALIMENTACIÓN CON UNA INFUSIÓN DE *Brassica oleracea* *botrytis**

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTION DE LA
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNA: MARIA CAMILA CARDOZO GUZMAN

TUTOR DEL TRABAJO: DR. ANTONIO MARTINEZ LOPEZ

COTUTORA EXTERNA: DRA. MARIA DOLORES RODRIGO ALIAGA

GEMA GARCIA CARRION

Curso Académico: 2016 - 2017

VALENCIA, junio de 2017

EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN DE *Caenorhabditis elegans* POR *Salmonella typhimurium* MEDIANTE LA ALIMENTACIÓN CON UNA INFUSIÓN DE *Brassica oleracea botrytis*

Maria Camila Cardozo Guzman, Antonio Martinez Lopez¹, Maria Dolores Rodrigo Aliaga, Gemma Garcia Carrion

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de infusión de coliflor (*Brassica oleracea Botrytis*) sobre *Caenorhabditis elegans* infectado con *Salmonella typhimurium*. Los resultados indicaron que respecto a la puesta de huevos, los nematodos infectados con *Salmonella typhimurium* y con medio de mantenimiento NGM ponen más huevos que los nematodos no infectados con *Salmonella*, presentando diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Respecto a la esperanza de vida del gusano se observó que en los percentiles 75, 50, 25 y 5 de los tratamientos donde se infectó con *Salmonella typhimurium* y se expuso a coliflor, los días de supervivencia aumentaron, este comportamiento se logra evidenciar incluso en el caso control en el que el nematodo se alimenta con *E. coli* OP50. Por lo tanto a tenor de los resultados parece que la infusión de coliflor estaría produciendo una acción sobre el patógeno evitando que se generaran los procesos de patogenicidad de la misma manera que sucedía en ausencia de la infusión de coliflor, minimizando los síntomas generados en las actividades biológicas monitoreadas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of infusion of Cauliflower (*Brassica oleracea Botrytis*) on *Caenorhabditis elegans* infected with *Salmonella typhimurium*, this nematode was used as an in vivo model, the results indicated that in relation to egg laying, nematodes infected with *Salmonella typhimurium* and NGM maintenance medium lay more eggs than nematodes not infected with *Salmonella*, presenting significant differences ($P \leq 0.05$). Respect to the life expectancy of the worm Observed that in the percentiles 75, 50, 25 and 5 of the treatments where it was infected with *Salmonella typhimurium* and exposed to cauliflower, the days of survival increased, this behavior is evidenced even in the control case in which the nematode is fed With *E. coli* OP50. Therefore, according to the results, it seems that the cauliflower infusion would be producing an action

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos-Consejo superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC), Carrer del Catedratic Agustín Escardino Benlloch 7, 46980 Paterna (Valencia), España.

on the pathogen avoiding the generation of the pathogenicity processes in the same way that it happened in the absence of the infusion of cauliflower, minimizing the symptoms generated in the biological activities monitored.

RESUM

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar l'efecte d'infusió de colflor (*Brassica oleracea* Botrytis) sobre *Caenorhabditis elegans* infectat amb *Salmonella typhimurium*. Els resultats indicaren, que respecte a la posta d'ous, els nematodes infectats amb *Salmonella typhimurium* i amb medi de manteniment NGM fiquen més ous que els nematodes no infectats amb *Salmonella*, presentant diferències significatives ($P \leq 0.05$). En quant a l'esperança de vida del cuc, es va observar que en els percentils 75, 50, 25 i 5 dels tractaments on es va infectar amb *Salmonella typhimurium* i es va exposar a colflor, els dies de supervivència van augmentar, aquest comportament s'aconsegueix evidenciar fins i tot en el cas control en què el nematode s'alimenta amb *E. coli* OP50. Per tant, observant els resultats sembla que l'infusió de colflor podria estar realitzant una acció sobre el patògen evitant que es produïsquen els processos de patogenicitat de la mateixa manera que succeïa en absència de la infusió de coliflor, minimitzant els símptomes generats en les activitats biològiques monitoritzades.

PALABRAS CLAVE: antimicrobianos, *Brassica oleracea* Botrytis, *Caenorhabditis elegans*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* OP50, huevos, esperanza de vida.

INTRODUCCION

El uso de antibióticos en animales de granja para asegurar un estado sano a la hora de su sacrificio y consumo y como promotores de crecimiento, ha generado con el tiempo cierto riesgo para la salud de los consumidores, esto debido al desarrollo de resistencias en bacterias presentes usualmente en los animales (Enrrecalde; 2004).

Microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium* se ha relacionado con el consumo de alimentos de origen animal, como las carnes de aves y huevos. *Salmonella spp.* es un bacilo Gram negativo, oxidasa negativo, anaerobio facultativo, no esporulado perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, móvil y termolábil, su temperatura óptima de crecimiento es de 37 a 40°C, se encuentra comúnmente en los intestinos de aves y mamíferos. *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.*, son las principales causas de zoonosis transmitidas por los alimentos en todo el mundo. En 2010, la campilobacteriosis y la salmonelosis fueron las zoonosis más frecuentemente notificadas en la Unión Europea, con 212.064 y 99.020 casos humanos confirmados respectivamente (EFSA, 2012). Numerosos estudios han demostrado que el consumo de productos avícolas crudos o poco cocinados es la principal causa de campilobacteriosis y salmonelosis humanas (Altekruse et al., 2000). Considerando los datos epidemiológicos publicados en los últimos años el control de la contaminación de las canales de aves es de gran importancia para la industria alimentaria, así como la salud de los animales (Chaine et al., 2013).

El uso de antimicrobianos naturales provenientes de aceites esenciales e infusiones de plantas son alternativas, no curativas, que ofrecen opciones para el control de bacterias patógenas in vitro, asociados a compuestos antioxidantes como los polifenoles, los cuales son compuestos bioactivos extraídos de plantas que tienen numerosas propiedades farmacológicas, como actividades antimicrobianas, antioxidantes, antivirales y anticancerígenas. Estudios epidemiológicos sugieren que el aumento de la ingesta dietética de frutas y vegetales ricos en polifenoles promueve la salud humana. Se cree que la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos se debe a una interferencia directa con el crecimiento bacteriano o la inhibición de la producción de factores de virulencia, lo que resulta en una patogénesis atenuada (Ivanova et al., 2013).

Numerosos inhibidores de Quórum sensing (QS) se han extraído de fuentes naturales, tales como plantas, hierbas y hongos. Las plantas y los hongos producen naturalmente inhibidores QS como su primera línea de defensa contra las bacterias patógenas, impidiendo su colonización y atenuando su virulencia (Rasmussen et al., 2006). Una serie de inhibidores de QS extraídos de frutos han demostrado interferir los sistemas de QS bacteriano dependientes de AHL, como el ácido elágico, ácido tánico y pirogalol, considerándose agentes anti-infectivos alternativos. Se han reportado una serie de plantas y extractos de hierbas incluyendo ajo, zanahoria, frijol, nenúfar, manzanilla, habanero y propóleo capaz

de suprimir los genes de virulencia regulados por QS. Se encontró que el más eficaz era el extracto de ajo que contenía al menos tres inhibidores diferentes de la vía QS (Ivanova et al., 2013).

La coliflor (*Brassica oleracea Botrytis*) es una planta herbácea anual, bienal o perenne, alógamas con autoincompatibilidad no total, tallos cortos, gruesos, poco o nada ramificados, sin yemas axilares. Es una inflorescencia formada por los pecíolos y botones florales apelmazados. Se cultiva por sus inflorescencias comestibles. Es una de las variedades más importantes de *B. oleracea*, y gracias a su alto contenido nutricional se siembra en todo el mundo. La característica más significativa de la coliflor es que, a diferencia de otras variedades de *B. oleracea*, la inflorescencia se forma durante el desarrollo floral, la cual determina directamente el valor económico de la coliflor (Li et al., 2017). Se ha encontrado que muchas hortalizas de la familia Crucífera tienen propiedades antimicrobianas contra varios microorganismos de importancia clínica. Este efecto antibacteriano del jugo de *Brassica oleracea* sobre varios patógenos transmitidos por los alimentos se ha evidenciado en diversos trabajos (Brandi et al., 2006).

Debido a estas propiedades y a la presencia de polifenoles en infusiones de coliflor, dichas infusiones pueden ser una alternativa para usarse en alimentos para animales y así disminuir la carga microbiana patógena presente en el momento del sacrificio en mataderos industriales. Para ello, es necesario realizar evaluaciones in vivo para verificar el efecto antibacteriano causado en el tracto intestinal infectados con *Salmonella typhimurium*.

Con el fin de poder realizar pruebas in vivo se ha escogido como modelo a *Caenorhabditis elegans*. Este organismo es un nematodo hermafrodita invertebrado que se alimenta de bacterias y habita en el suelo. Debido a la conservación de muchos procesos biológicos homologables con mamíferos como por ejemplo el alto grado de superposición en términos de genes vertebrados ortólogos, así como los factores de virulencia comunes, en conjunto, hace de *C. elegans* un modelo interesante para estudiar las interacciones huésped-patógeno. Además, los aspectos del envejecimiento son similares entre los nematodos y los mamíferos, incluidos los humanos. Por ejemplo, la sarcopenia, la pérdida de masa muscular, es una característica importante del envejecimiento en los seres humanos y *C. elegans* y contribuye a la disminución del comportamiento relacionado con el envejecimiento en ambos (Wilson et al 2006). Para estudiar la interacción con cualquier patógeno bacteriano, la fuente de alimento de *C. elegans* se reemplaza con el patógeno de elección, y luego se monitorean parámetros como la movilidad, la puesta de huevos del nematodo y la esperanza de vida (Verma et al., 2015).

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito se espera poder realizar las evaluaciones in vivo para dilucidar si existe una acción antimicrobiana de los extractos de coliflor contra la *Salmonella typhimurium* en el tracto digestivo de *C. elegans*, tomando como referencia la interacción presentada como simulación del comportamiento en organismos vertebrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del cultivo de *Escherichia coli* OP50

Para la conservación de la cepa de alimentación usada para *C. elegans* durante todo el estudio realizado, se prepararon 500 ml de medio LB (Luria Bernati) y se inoculó con un vial de *E. coli* OP50 resuspendido en 5 ml del mismo medio, se incubó en agitación toda la noche a 37 °C, posteriormente se dividió en tubos de 50 ml estériles, se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante de cada tubo, se rotularon y se llevaron a congelación a -80 °C. Para la reactivación de cada tubo se resuspendieron en 5 ml de medio LB obteniendo una concentración 10⁸ UFC.

Preparación del cultivo de *Salmonella typhimurium*

Para poder asegurar la estabilidad, pureza, mantenimiento y conservación de la cepa patógena usada durante el estudio, se prepararon 500 ml de medio TSB (Tryptic Soy Broth, Scharlab chemie) y se inoculó con un vial de *Salmonella typhimurium* conservada en el laboratorio, esta cepa corresponde a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 443), se resuspendió en 5 ml del mismo medio, se incubó en agitación toda la noche a 37 °C, posteriormente se dividió en tubos de 50 ml estériles, se centrifugó a 4000 rpm por 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante de cada tubo, se rotularon y se llevaron a congelación a -80 °C. Para la reactivación de cada tubo se resuspendieron en 5 ml de medio TSB obteniendo una concentración 10⁸ UFC.

Cultivo y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

Se preparó medio NGM (Nematode Growth Media), con 3 g de NaCl, 2,5 g de peptona, 17 g de agar bacteriológico, se esterilizó, posteriormente cuando se aatemperó fue suplementado con 1 ml de colesterol al 0,5% preparado en etanol al 96% esterilizado por filtración y vertido lentamente para evitar que se precipitara, 1 ml de cloruro de calcio al 1M, 1 ml de Sulfato de Magnesio al 1M y 25 ml de tampón 1M, el cual se realizó con una solución de 8,16 g de KH₂PO₄ en 60 ml de agua destilada y se reguló el pH a 6 con una solución de 25 ml con 4,35 g de K₂HPO₄. El medio finalmente se mezcló y se sirvió en placas grandes con 20 ml cada una, al solidificarse se realizó una siembra en superficie masiva de *E. coli* OP50, se incubaron a 37°C toda la noche y se almacenaron a 4°C.

Los nematodos se cultivan en las placas de NGM a 20 °C selladas con parafilm para evitar la deshidratación del medio, este proceso se deberá realizar con el fin de mantener las condiciones óptimas necesarias para el estudio y bajo un ambiente controlado para que tengan el mínimo efecto en la longevidad, los

nematodos se transfieren cada 48 horas a placas nuevas con un césped de *E. coli* OP50 manteniendo el stock con *C. elegans* sano.

Preparación de medio con infusión de *Brassica oleracea Botrytis*

La preparación de la infusión se realizó al 3% de Coliflor (*Brassica oleracea Botrytis*), la cual se agregó en agua peptonada al 0,1% después de llegar a punto de ebullición, se dejó en proceso de extracción por 30 minutos sin calentamiento adicional y posteriormente se centrifugó en tubos de 250 ml a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante y se filtró al vacío con papel wathman N°1 para eliminar solidos que interfirieran con la preparación del medio de cultivo, el filtrado se esterilizo posteriormente. Para la preparación del medio a 975 ml de infusión estéril se le agregaron 3 g de NaCl, 2,5 g de peptona y 17 g de agar bacteriológico, se esterilizo y cuando se atempero se suplementó con 1 ml de colesterol al 0,5% preparado en etanol al 96% esterilizado por filtración, 1 ml de cloruro de calcio al 1M, 1 ml de Sulfato de Magnesio 1M y 25 ml de tampón, finalmente se mezcló y se adicionaron 2 ml de medio en placas pequeñas de 60x15 mm.

Sincronización de *Caenorhabditis elegans*

Para sincronizar *C. elegans* se cultivaron 20 gusanos en una placa de medio NGM con césped de *E. coli* OP50, se incubaron toda la noche a 20°C y al día siguiente se extrajeron los 20 gusanos dejando únicamente los huevos y las larvas, esta placa sincronizada se incubó durante dos días y se utilizó la población obtenida para el trabajo a realizar. Este proceso se realizó todas las semanas del estudio para poder tener poblaciones frescas con adultos jóvenes sincronizados disponibles para los estudios.



FIGURA 1. Placa de *C. elegans* sincronizada en medio NGM

Tratamientos realizados

Para la evaluación de la infusión de coliflor se realizaron los tratamientos descritos en la Tabla 1, donde se evaluó la esperanza de vida y la puesta de huevos del nematodo en presencia y ausencia tanto de la infección con *S. typhimurium* como de la infusión de coliflor al 3%. En todos los tratamientos se alimentó el nematodo con *E. coli* OP50, incluso cuando *C. elegans* había sido infectado con el patógeno.

TABLA 1. Descripción de tratamientos realizados.

Numero de tratamientos	Descripción del tratamiento	Nomenclatura
1	<i>C. elegans</i> en medio NGM con infusión de coliflor al 3% infectado con <i>Salmonella typhimurium</i> por 5 horas y alimentado con <i>E. coli</i> .	OP_ST_COL
2	<i>C. elegans</i> en medio NGM con infusión coliflor al 3% alimentado con <i>E. coli</i> .	OP_COL
3	<i>C. elegans</i> en medio NGM infectado con <i>Salmonella typhimurium</i> por 5 horas alimentado con <i>E. coli</i> .	OP_ST_NG
4	<i>C. elegans</i> en medio NGM con <i>E. coli</i> OP50	OP_NG

Infección de *C. elegans* con *Salmonella typhimurium*

La infección de *C. elegans* se realizó poniendo en contacto el gusano en una placa de medio NGM con un césped de *Salmonella typhimurium*, alcanzadas las 5 horas de exposición se extrajeron los gusanos y se transfirieron a una placa con césped de *E. coli* OP50 con y sin adición del extracto de coliflor.

Esperanza de vida de *C. elegans*

Se realizó el análisis de la esperanza de vida de *C. elegans* durante 21 días de seguimiento y conteo de gusanos vivos. Para la estudio se pusieron 10 gusanos por placa de medio NGM o NGM con infusión de coliflor según el tratamiento que se estuviese evaluando, teniendo una población total por replica de 50 nematodos, los medios tenían césped de *E. coli* OP50 crecido, si el tratamiento evaluado lo requiera se debía realizar la infección con *Salmonella*

typhimurium por 5 horas previamente. Este procedimiento se llevó a cabo con 5 réplicas y 5 repeticiones respectivamente para cada tratamiento.

Puesta de huevos de *C. elegans*

Para el análisis de puesta huevos se realizaron 5 réplicas y 5 repeticiones respectivamente en cada tratamiento, este procedimiento se llevó a cabo por un seguimiento de 4 días, donde se realizó el conteo de huevos puestos por un gusano en cada placa dos veces al día, mañana y tarde, con un intervalo promedio de 8 horas entre los seguimientos.

Análisis de datos

El análisis de datos de la puesta de huevos se realizó con Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., EE.UU.), este procedimiento comparo los datos de los 4 tratamientos, realizando las pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras, la prueba-F en la tabla ANOVA determino si habían diferencias significativas entre las medias y las Pruebas de Rangos Múltiples establecieron cuáles tratamientos eran significativamente diferentes entre ellos, estableciendo diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza en el caso que el P valor fue menor a 0,05.

El análisis de datos de la esperanza de vida se estudió con el software Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., EE.UU.), se realizó por medio de las tablas de vida por intervalos. Las probabilidades estimadas de supervivencia mostraron cuales de las poblaciones expuestas a que tratamientos estuvieron en riesgo en cada uno, cuántos nematodos murieron antes de finalizar el tratamiento, y cuántos murieron por manipulación (censurados) durante el tratamiento. También se estableció la Supervivencia Acumulada mostrando la probabilidad estimada por tratamiento, se evaluó el Riesgo en términos de la función de riesgo estimada (tasa de mortalidad) a lo largo de cada tratamiento. El análisis de la Densidad, mostro un estimado para la función de densidad de la correspondiente distribución de esperanza de vida, con los respectivos errores estándar para cada una de las funciones.

Los percentiles considerados para la distribución de esperanza de vida por tratamiento estimaron el espacio de tiempo que un porcentaje seleccionado de la población sobrevivió bajo las condiciones del tratamiento analizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio realizado con *C. elegans* como modelo para evaluar la interacción huésped-patógeno (Verma, 2015), se enfocó en dos tipos de seguimientos in-vitro, la puesta de huevos y la esperanza de vida del nematodo expuesto a los diferentes tratamientos descritos en la metodología, infectándolo con *Salmonella typhimurium*, observando el comportamiento en presencia y ausencia de infusión

de coliflor al 3% en medio NGM y de la infección, comparándose con los resultados obtenidos con OP50 como control en los dos tipos de medio usados.

Los resultados del estudio donde se relaciona la puesta de huevos del gusano se pueden apreciar en la figura 2. Se observa que los nematodos infectados con *Salmonella typhimurium* y con medio de mantenimiento NGM presentan una puesta de huevos mayor que los gusanos expuestos a los otros tratamiento realizados, existiendo diferencias significativas con un valor P menor a 0.05 con respecto a los otros tratamientos evaluados, indicando que en estados de infección con este patógeno el gusano eleva la tasa de puesta de huevos, demostrando que hay una alteración en el comportamiento, sin embargo no se ve afectado el proceso reproductivo del nematodo, pero si estimulado debido probablemente al estrés fisiológico presentado al estar infectado con este patógeno.

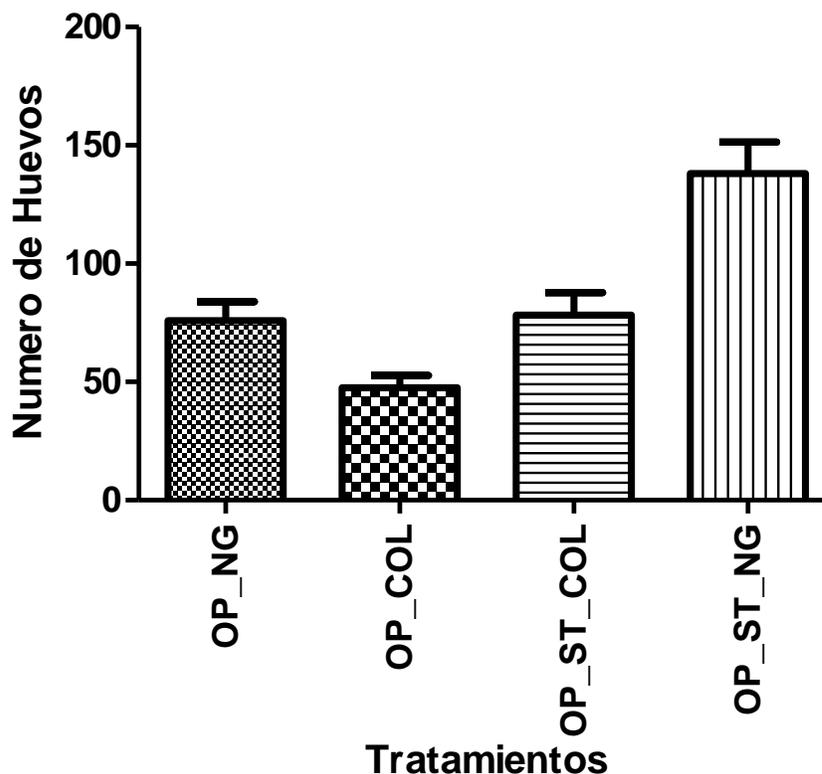


FIGURA 2. Numero de huevos puestos por *C. elegans* durante 4 días de seguimiento, expuestos a los 4 diferentes tratamientos.

Entre los tratamientos donde se presenta alimentación con OP50 en medio NGM y se expone *C. elegans* a una infección con *Salmonella typhimurium* en medio con infusión de coliflor al 3%, no hay diferencias significativas ($P < 0,05$),

por lo tanto el comportamiento es similar en este caso. Hay que destacar que en el caso del nematodo infectado con el patógeno, al estar en contacto con infusión de coliflor, se logra evidenciar una disminución significativa en la puesta de huevos. De alguna manera, los componentes del extracto de coliflor mitigan la infección producida por *Salmonella typhimurium*. Este comportamiento puede ser de interés en la preparación de piensos para animales donde *Salmonella typhimurium* puede llegar a tener una incidencia elevada en seguridad alimentaria.

La función estimada de supervivencia, realizada a partir de los datos obtenidos en el análisis de esperanza de vida para los tratamientos evaluados, refleja la fracción estimada de supervivientes de las poblaciones analizadas bajo condiciones controladas, donde se evidencia una disminución acelerada de la población en los tratamientos que no tenían infusión de coliflor. Este comportamiento se puede ver en las figuras 3, 4, 5 y 6. En estas graficas se puede ver con claridad el impacto positivo que tiene el extracto de coliflor sobre la supervivencia del nematodo.

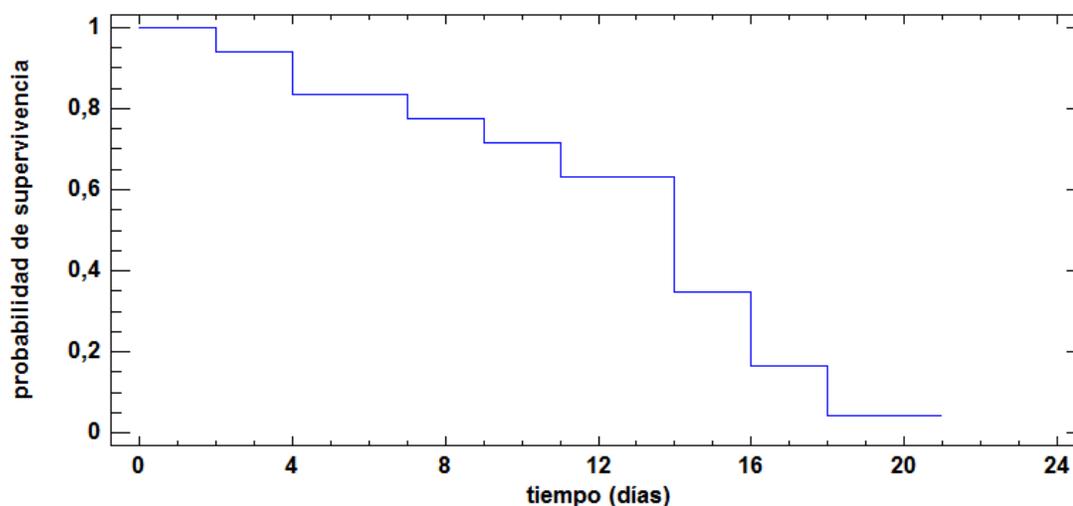


FIGURA 3. Función estimada de supervivencia para el tratamiento OP_COL (*C. elegans* en medio NGM con infusión coliflor al 3% alimentado con *E. coli.*)

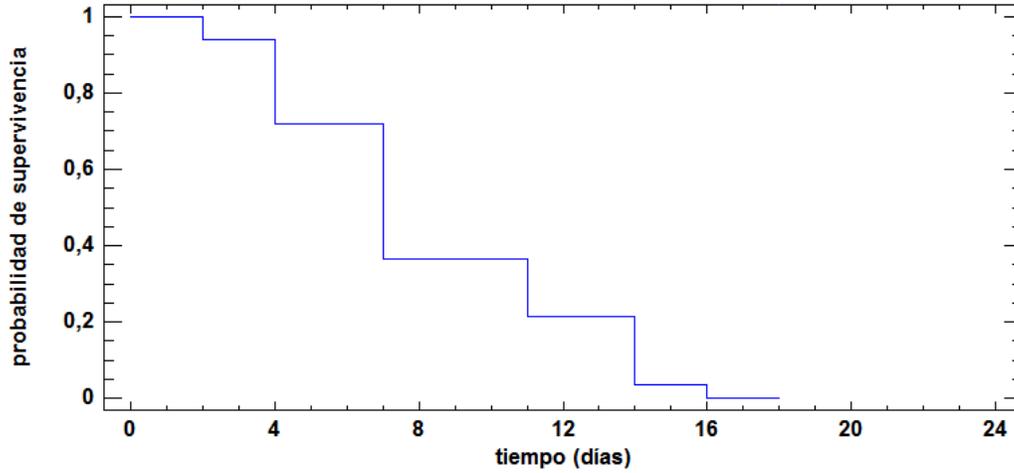


FIGURA 4. Función estimada de supervivencia para el tratamiento OP_NG (*C. elegans* en medio NGM con *E. coli* OP50)

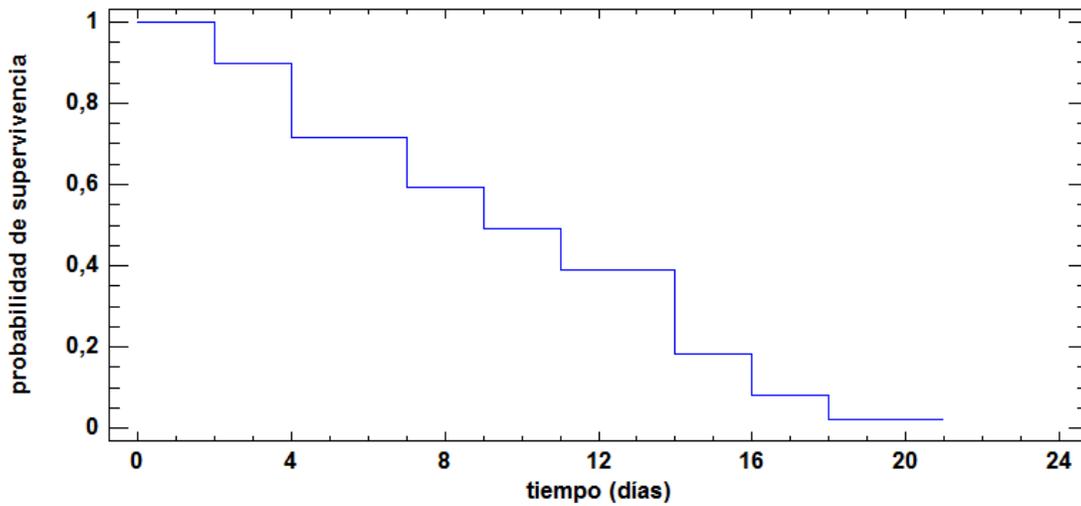


FIGURA 5. Función estimada de supervivencia para el tratamiento OP_ST_COL (*C. elegans* en medio NGM con infusión de coliflor al 3% infectado con *Salmonella typhimurium* por 5 horas y alimentado con *E. coli*.)

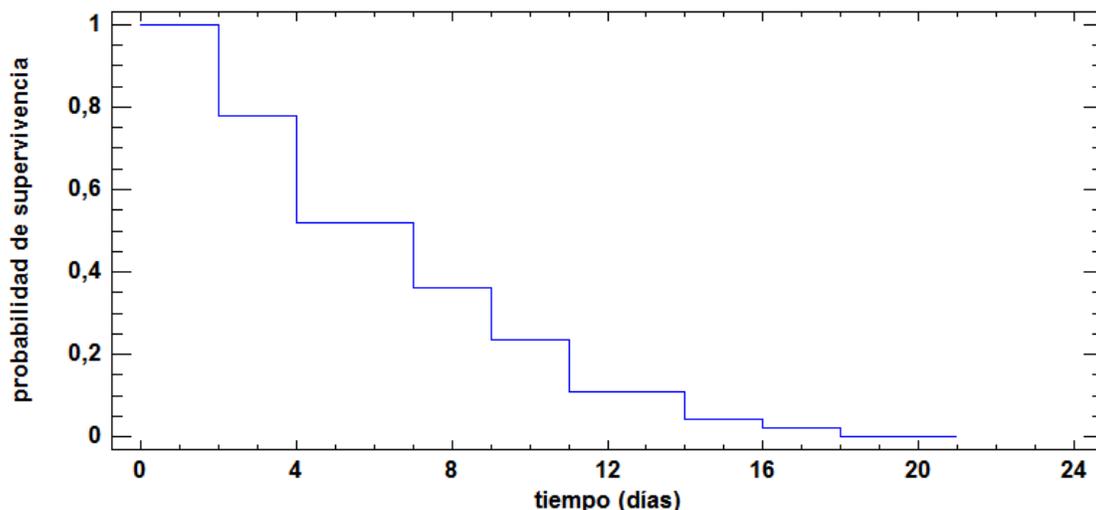


FIGURA 6. Función estimada de supervivencia para el tratamiento OP_ST_NG (*C. elegans* en medio NGM infectado con *Salmonella typhimurium* por 5 horas alimentado con *E. coli*)

En la tabla 2 se pueden observar los percentiles estimados para la distribución de esperanza de vida de *C. elegans*. Los percentiles estiman el espacio de tiempo que un porcentaje seleccionado de la población sobrevivirá.

TABLA 2. Tabla de percentiles de esperanza de vida de *C. elegans* al ser expuesto a los diferentes tratamientos evaluados.

Percentiles%	OP_ST_NG Días de supervivencia	OP_ST_COL Días de supervivencia	OP_NG Días de supervivencia	OP_COL Días de supervivencia
75	2.2 ± 0.6	3.6 ± 0.8	3.7 ± 0.6	7.8 ± 2.6
50	4.4 ± 1.8	8.8 ± 1.8	5.8 ± 0.7	12.4 ± 0.9
25	8.8 ± 1.9	13.0 ± 1.6	10.5 ± 1.6	15.1 ± 1.3
5	13.7 ± 10	17.0 ± 8.1	13.7 ± 2.6	17.9 ± 2.8

El análisis de esperanza de vida realizado con cada uno de los tratamientos evaluados en *C. elegans* determinó que en los percentiles 75, 50, 25 y 5 de los tratamientos donde se infectó con *Salmonella typhimurium* y se expuso a coliflor, los días de supervivencia aumentaron, este comportamiento se pone de manifiesto incluso en el caso control con *E. coli* OP50, donde la esperanza de vida se incrementa cuando el nematodo se expone a la infusión de coliflor.

En el tratamiento OP_ST_NG el 50% de la población logra sobrevivir a los 4,4 ± 1,8 días después de ser infectado con el patógeno, mientras que al exponerse a coliflor se duplican los días de supervivencia para este porcentaje de población de gusanos incrementándose a 8,8 ± 1,8 días, es decir, el extracto de coliflor

parece mitigar el efecto de *Salmonella typhimurium* sobre el nematodo, coincidiendo con lo observado anteriormente en la puesta de huevos.

En condiciones normales de crecimiento donde el nematodo se alimenta con *E. coli* OP50 el 50% de la población sobrevive $5,8 \pm 0,7$ días mientras que los nematodos que viven en el medio con coliflor este tiempo se incrementan a $12,4 \pm 0,9$ días. Diferentes trabajos han mostrado el efecto beneficioso de los polifenoles de plantas en cuanto al aumento de esperanza de vida del nematodo, en este caso para el percentil 50%, probablemente debido a un efecto antioxidante (Wilson, 2006)

Al establecer la función estimada del riesgo para *C. elegans* bajo los tratamientos evaluados, figuras 7 y 8, se observa el incremento de la tasa de mortalidad, con un aumento más rápido cuando el nematodo está infectado, acentuándose la velocidad de mortalidad a los 14 días y a los 16 días en ausencia de infección, sin embargo al ser tratado con coliflor el riesgo es disminuye.

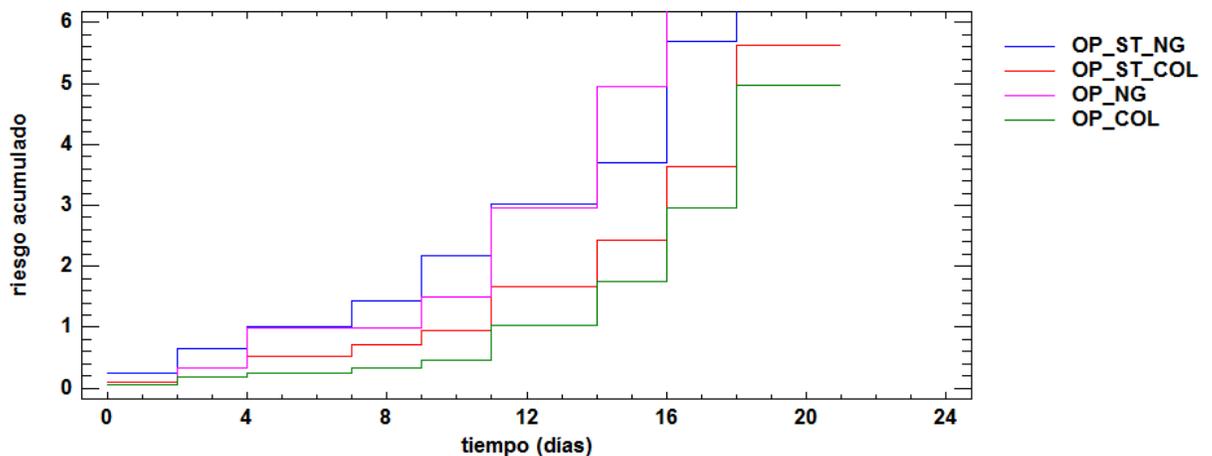


FIGURA 7. Función estimada del riesgo acumulado nematodos infectados con *Salmonella typhimurium* y tratados con coliflor al 3%, comparado con tratamientos a condiciones normales alimentado con *E. coli* OP50 en medio NGM.

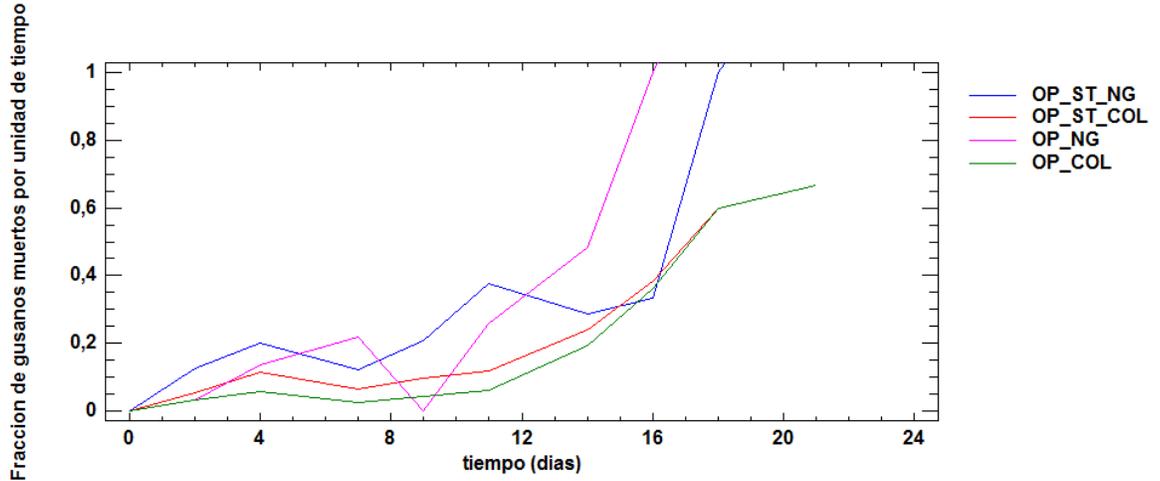


FIGURA 8. Función estimada del riesgo para nematodos infectados con *Salmonella typhimurium* y tratados con coliflor al 3%, comparado con tratamientos a condiciones normales alimentado con *E. coli* OP50 en medio NGM.

Según los resultados obtenidos la infusión de coliflor puede estar relacionada con la longevidad del gusano y la resistencia a condiciones de estrés cuando se encuentra infectado con el patógeno. Comportamientos similares se han obtenido en estudios de esperanza de vida en *C. elegans* donde se expone a compuestos polifenólicos extraídos de arándanos (Wilson, 2006). En el presente estudio se ha observado un incremento del 50% de la esperanza de vida promedio de *C. elegans* al ser tratado con coliflor. En la literatura científica hay trabajos en los que se observa un efecto positivo de los antioxidantes sobre la edad y la longevidad de modelos in vivo como el usado en este trabajo. Moriwaki et al., (2013) evaluaron la esperanza de vida de *C. elegans* y la adaptabilidad al estrés bajo el tratamiento de mezcla de plantas con actividad antioxidante. Wen et al. (2014) y Sadowska-Bartosz et al.,(2014) estudiaron distintas moléculas antioxidantes observando incrementos de la esperanza de vida del nemátodo frente a aditivos como Polidatina, resveratrol-3-O β -mono-D-glucósido es entre el 31% y el 62% bajo condiciones normales y bajo condiciones de estrés respectivamente. Este resultado es comparable con el establecido para la población y tratamientos evaluados en este estudio, donde se logran incrementos dentro del intervalo reportado.

Hay estudios en los que se ha observado que la infusión de coliflor tiene compuestos polifenólicos, los cuales poseen una alta capacidad antioxidante, y se considera que esta hortaliza es una buena fuente de compuestos antioxidantes como: ácido ferulico, ácido clorogenico, ácido galico, catequina y ácido hidroxicinamico (Bahorun et al., 2004) (Raja et al., 2011), también se encuentra reportada la vitamina C en coliflor según (Podsdek, 2007).

También se ha observado que los polifenoles presentes en té tienen la capacidad de minimizar la virulencia con actividad sobre la regulación de la patogenicidad mediada por QS en bacterias Gram negativas (Yin, 2015) (Ivanova, 2013). Teniendo en cuenta que la infusión de coliflor usada para el estudio dentro de su composición contiene compuestos polifenólicos (Podsedek, 2007) y al llevar a cabo tratamientos exponiendo al nematodo a infecciones controladas con *Salmonella typhimurium* con extracto de coliflor en el medio de crecimiento del nemátodo, se podría decir a la vista de los resultados obtenidos, respecto a la puesta de huevos y esperanza de vida que la infusión de coliflor estaría ejerciendo una acción sobre el patógeno, evitando que se generaran los procesos de patogenicidad de la misma manera que sucedía en ausencia de la infusión de coliflor, minimizando los síntomas generados en las actividades biológicas monitoreadas.

CONCLUSIONES

Como conclusión podemos decir que tras el estudio realizado donde se evaluó el efecto de la infusión de coliflor sobre *Caenorhabditis elegans* infectado con *Salmonella typhimurium*, se observó un incremento del 50% en la esperanza de vida de los nematodos infectados que recibieron un tratamiento con el extracto de coliflor, así mismo también se observó un incremento de la supervivencia de la población del 53% en los nematodos sin infectar y tratados con la infusión de coliflor concluyéndose que el extracto de coliflor adicionado a los piensos de animales de granja podría ser una buena opción de control de *Samonella typhimurium* en el intestino de los animales. No obstante habría que efectuar estudios de escalado en granja para corroborar lo que se ha obtenido in vivo con el nematodo.

AGRADECIMIENTO

Al instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA), al Consejo superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y especialmente al grupo de investigación Procesos de conservación y evaluación de riesgos, les agradezco por brindar los recursos para el desarrollo del proyecto presentado en este documento.

REFERENCIAS

- Altekruse, S.F.; Stern, N.J.; Fields, P.I.; Swerdlow, D.L. 2000. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, **5**: 28–35
- Bahorun, T. ; Luximon-Ramma, A. ; Crozier, A. ; Aruoma, O. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**: 1553–1561.
- Brandi, G. ; Amagliani, G. ; Schiavano, G.F. ; De Santi, M. ; . 2006 Activity of Brassica oleracea leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *Journal of food protection*, **69(9)**:2274-9.

- Chaine A. ; Arnaud E. ; Kondjoyan A. ; Collignan A. ; Sarter S. 2013. Effect of steam and lactic acid treatments on the survival of *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* inoculated on chicken skin. International Journal of Food Microbiology **162(3)** : 276-282
- Curt, A.; Zhang, J. ; Minnerly J. ; Jia, K. 2014. Intestinal autophagy activity is essential for host defense against *Salmonella typhimurium* infection in *Caenorhabditis elegans*. Developmental and comparative immunology **45** : 214-218.
- Errecalde, J. O. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo - incidencias del desarrollo de resistencias en la salud pública .Organización para las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. (162). Inc. FAO Producción y sanidad animal 1-61.
- Garsin, D. A. ; Sifri, C.D; Mylonakis, E. ; Qin, X.; Singh, K. V.; Murray, B. E.; Calderwood, S. B.; Ausubel, F. M. 2001. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. PNAS **19** : 10892–10897.
- Ivanova, K ; Fernandes, M; Tzanov, T. 2013. Current advances on bacterial pathogenesis inhibition and treatment strategies. Formatex 322-336.
- Li, H. Liu, Q. Zhang Q. Quin, E. Jin, C. Wang, Y. Wu, M. Shen, G. Chen, C. Song, W. Wang, C. 2017. Curd development associated gene (CDAG1) in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) could result in enlarged organ size and increased biomass. Plant Science, **245** : 82 – 94
- Moriwaki, T. ; Kato, S.; Kato, Y.; Hosoki, A.; Zhang-Akiyama, Q. 2013. Extension of lifespan and protection against oxidative stress by an antioxidant herb mixture complex (KPG-7) in *Caenorhabditis elegans*. J. Clin. Biochem. Nutr. **53(2)** :81-88
- Podsedek, A ; 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. Science direct **40**: 1-11
- Raja, M., Imran, M., Rahman, H., 2011. Quality aspects of cauliflower during storage. International Food Research Journal **18**, 427–432
- Rasmussen, T. B. Givskov, M. 2006. Quorum sensing inhibitors: A bargain of effects. Microbiology, **152** : 895-904
- Sadowska-Bartos, I.; Bartosz, G. 2014. Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. BioMed Research International, **2014** : 1-17
- Verma, S.; Srikanth, C. V. 2015. Understanding the complexities of Salmonella-host crosstalk as revealed by in vivo model organisms. International union of biochemistry and molecular biology **67**: 482-497
- Wen, H. ; Gao, X. ; Qin, J. 2014. Probing the anti-aging role of polydatin in *Caenorhabditis elegans* on a chip. Integrative Biology **6** : 35-43
- Wilson, M. A.; Shukitt-Hale, B.; Kalt. W; Ingram, D.K; Josep J.A; Wolkow, C. 2006. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. Aging Cell **5**: 59-68.
- Yin, H.; Deng, Y.; Wang, H.; Liu, W.; Zhuang, X.; Chu, W. 2016. Tea polyphenols as an antivirulence compound Disrupt Quorum-Sensing Regulated Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports. **5**, 16158; doi: 10.1038/ srep16158