



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



iata
Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA

**CONTROL DE LA INFECCIÓN POR
SALMONELLA EN C.ELEGANS
MEDIANTE ANTIMICROBIANOS
NATURALES**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
LOS ALIMENTOS

Escuela Técnica Superior De Ingeniería Agronómica y Del Medio Natural

ALUMNA: MARTA SANZ HORCAS

TUTOR: DR. ANTONIO MARTINEZ LÓPEZ

COTUTOR EXTERNO: DRA. MARIA DOLORES RODRIGO ALIAGA

DIRECTOR EXPERIMENTAL: DIANA IBAÑEZ PEINADO

Curso Académico: 2017-2018

VALENCIA, Junio de 2018

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de un extracto de coliflor sobre la concentración de *Salmonella* Typhimurium en el intestino del *C. elegans*. El objetivo era poder establecer si es posible reducir la carga microbiana por el efecto antimicrobiano del extracto de coliflor. Los resultados indican que cuando el nematodo es infectado con *Salmonella* y se alimenta en ausencia de extracto de coliflor se produce un notable aumento de la concentración del patógeno en el intestino del nematodo a las 24 horas de la infección, para ir disminuyendo a la hora 48 hasta aproximadamente medio ciclo logarítmico y ligeramente aumentar a las 96h. En el caso del nematodo infectado alimentado en un extracto de coliflor, se observa un efecto similar, un aumento inicial en el número de patógenos en el intestino del gusano a las 24 horas de la infección, aunque este aumento es inferior al que se produjo cuando se alimentó en ausencia de coliflor. Igualmente se produce una disminución en la concentración del patógeno a las 48 horas, y en este caso, la disminución es de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos. La concentración de patógeno a las 96 h observadas fue ligeramente reducida. Por consiguiente, podemos decir que en estas condiciones de experimentación *in vivo* hay un efecto antimicrobiano que se podría aprovechar para el desarrollo de piensos con capacidad antimicrobiana tras llevar a cabo los pertinentes ensayos de campo y optimización de la incorporación del extracto a las formulaciones específicas para cada animal de granja.

RESUM

S'ha estudiat l'efecte d'un extracte de coliflor sobre la concentració de *Salmonella* Typhimurium en l'intestí del *C. elegans*. L'objectiu era poder establir si és possible reduir la càrrega microbiana per l'efecte antimicrobià de l'extracte de coliflor. Els resultats indiquen que quan el nematode és infectat amb *Salmonella* i s'alimenta en absència d'extracte de coliflor es produeix un notable augment de la concentració del patogen a l'intestí del nematode a les 24 hores de la infecció, per anar disminuint a l'hora 48 fins aproximadament mig cicle logarítmic i lleugerament augmentar a les 96h. En el cas del nematode infectat alimentat en un extracte de coliflor, s'observa un efecte similar, un augment inicial en el nombre de patògens a l'intestí del cuc a les 24 hores de la infecció, tot i que aquest augment és inferior al que es va produir quan es va alimentar en absència de coliflor. Igualment es produeix una disminució en la concentració del patogen a les 48 hores, i en aquest cas, la disminució és d'aproximadament 2 cicles logarítmics. La concentració de patogen a les 96 h observades va ser lleugerament reduïda. Per tant, podem dir que en aquestes condicions d'experimentació *in vivo* hi ha un efecte antimicrobià que es podria aprofitar per al desenvolupament de pinsos amb capacitat antimicrobiana després de

dur a terme els pertinents assajos de camp i optimització de la incorporació de l'extracte a les formulacions específiques per a cada animal de granja.

ABSTRACT

The effect of a cauliflower extract on the concentration of *Salmonella* Typhimurium in the intestine of *C. elegans* has been studied. The objective was to establish if it is possible to reduce the microbial load due to the antimicrobial effect of cauliflower extract. The results indicate that when the nematode is infected with *Salmonella* and fed in the absence of cauliflower extract, there is a notable increase in the concentration of the pathogen in the intestine of the nematode 24 hours after infection, to decrease at 48 hours. Until approximately half logarithmic cycle and slightly increase at 96h. In the case of the infected nematode fed on a cauliflower extract, a similar effect is observed, an initial increase in the number of pathogens in the intestine of the worm at 24 hours after infection, although this increase is lower than that which occurred when it was fed in the absence of cauliflower. Likewise, there is a decrease in the concentration of the pathogen at 48 hours, and in this case, the decrease is approximately 2 logarithmic cycles. The pathogen concentration at 96 h observed was slightly reduced. Therefore, we can say that in these conditions of in vivo experimentation there is an antimicrobial effect that could be used for the development of feed with antimicrobial capacity after carrying out the pertinent field trials and optimizing the incorporation of the extract to the specific formulations for every farm animal.

PALABRAS CLAVE: *Salmonella*, *C. elegans*, infección, lisis, antimicrobianos.

PARAULES CLAU: *Salmonella*, *C. elegans*, infecció, lisi, antimicrobians.

KEY WORDS: *Salmonella*, *C. elegans*, infection, lysis, antimicrobial.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Preparación del cultivo de <i>Escherichia coli</i> OP50	10
3.2. Preparación del cultivo de <i>Salmonella</i> Typhimurium	10
3.3. Cultivo y mantenimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i>	10
3.4. Preparación de medio con infusión de <i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	12
3.5. Procedimiento de trabajo	12
3.5.1. Sincronización de <i>Caenorhabditis elegans</i>	13
3.5.2. Infección de <i>C. elegans</i> con <i>Salmonella</i> Typhimurium	13
3.5.3. Lisis de <i>C. elegans</i>	14
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
5. RESULTADOS Y DISCUSION	15
5.1 Efecto de la infección por <i>Salmonella</i> Typhimurium en <i>C. elegans</i> .	15
5.2 Efecto de la alimentación del <i>C. elegans</i> con extracto de coliflor sobre la concentración de <i>Salmonella</i> en el intestino del nematodo.	17
5.3 Comparación de la evolución de la infección por <i>Salmonella</i> typhimurium en el <i>C. elegans</i> alimentado sin y con extracto de coliflor.	19
6. CONCLUSIONES	23
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. INTRODUCCIÓN

Las aves y cerdos son un reservorio para muchos microorganismos patógenos que se pueden transmitir a través de los alimentos produciendo enfermedades en el consumidor. Estas enfermedades son más o menos graves en función del microorganismo que está contaminando el alimento.

Especialistas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirman que más del 70% de las enfermedades diarreicas agudas proceden de los alimentos y el agua contaminados (Castro Domínguez, 2008).

Según indica la OMS (2015), "La carga de las enfermedades de transmisión alimentaria es considerable: cada año, aproximadamente una de cada 10 personas contrae una enfermedad de origen alimentario y 420.000 mueren como consecuencia de estas enfermedades".

Datos epidemiológicos de diversos estudios demuestran que los productos cárnicos son un canal importante de transmisión para la infección por *Salmonella* (Bello-Pérez *et al.*, 1990, pág. 75), debido a que la carne contaminada es "especialmente peligrosa cuando se ha mantenido bajo circunstancias que favorecen la multiplicación de la *Salmonella* y especialmente durante la época de calor" (Acosta Malucín, 2007).

Actualmente las Agencias de Seguridad Alimentaria de los países de la UE y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) proporcionan asesoramiento científico independiente y asistencia científica mediante la recopilación y el análisis de datos sobre la prevalencia de *Salmonella* en animales y alimentos, y evalúan los riesgos de seguridad alimentaria planteados por la bacteria para la salud humana, asesorando sobre el posible control y opciones de mitigación.

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). Según el informe de la reunión de la EFSA (2012) relacionado con patógenos transmitidos por alimentos de origen zoonótico, se han descrito *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* con incidencia en pollos de engorde y productos de origen animal crudo. 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).

Actualmente, la *Salmonella* sigue siendo una de las principales preocupaciones de las autoridades sanitarias en la Unión Europea. La *Salmonella* puede causar graves problemas gastrointestinales, infecciones e intoxicaciones. La transmisión a los seres humanos se produce por el consumo de alimentos contaminados procedentes de animales infectados

(huevos y carne de pollo, pavos y cerdos) o a través de alimentos en los que se ha producido contaminación cruzada, como frutas y vegetales (FDA, 2012). Otra forma de transmisión es a través del contacto con animales infectados. En esto se incluye también a las mascotas, aún si éstas no presentan signos de enfermedad. Igualmente, la bacteria puede transmitirse entre las personas por vía fecal-oral, esto se debe frecuentemente a una escasa higiene personal.

El síntoma más frecuente entre las enfermedades por contaminación alimentaria, es la diarrea (Dirección General de Epidemiología, 2015, pág. 676). El cuadro clínico aparece generalmente entre el primer y tercer día después de la contaminación. Dependiendo de una serie de características estructurales de las bacterias, en el ser humano, la *Salmonella* da lugar a dos cuadros clínicos.

Por un lado, la fiebre tifoidea y paratifoidea están originadas por bacterias pertenecientes a los serotipos *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, que se caracterizan por infectar únicamente a las personas. El otro cuadro clínico es la salmonelosis que está originada por diferentes serotipos, siendo los más comunes *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. A diferencia de los otros dos, estos dos serotipos son zoonóticos y afectan al ser humano y a un gran número de animales domésticos y silvestres. La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial, aunque parece ser más frecuente en aquellas zonas donde se practica la ganadería intensiva.

Si infecta el torrente sanguíneo, puede poner en peligro la vida. Se puede contagiar a los humanos a través de alimentos contaminados. El manejo seguro de la carne cruda y otros ingredientes alimenticios crudos, la cocción completa y la buena higiene de la cocina pueden prevenir o reducir el riesgo que representan los alimentos contaminados (EFSA, 2017).

La *Salmonella* es capaz de pasar a través de la cadena alimentaria completa, es decir, desde la alimentación a los animales de granja y el proceso de producción de cárnicos hasta los hogares o los establecimientos comerciales o de servicios de comidas, etc. (Rodríguez y Silva, 2017).

A pesar de todas las medidas de control que se vienen adoptando, la salmonelosis sigue siendo la segunda zoonosis más frecuentemente notificada en personas en la Unión Europea (UE) detrás de la Campilobacteriosis. En la UE, se reportan más de 100.000 casos humanos cada año según la EFSA (EFSA 2016), por ello, para proteger a los consumidores de esta zoonosis, la UE ha adoptado un enfoque integrado para la seguridad de los alimentos desde la granja hasta la mesa.

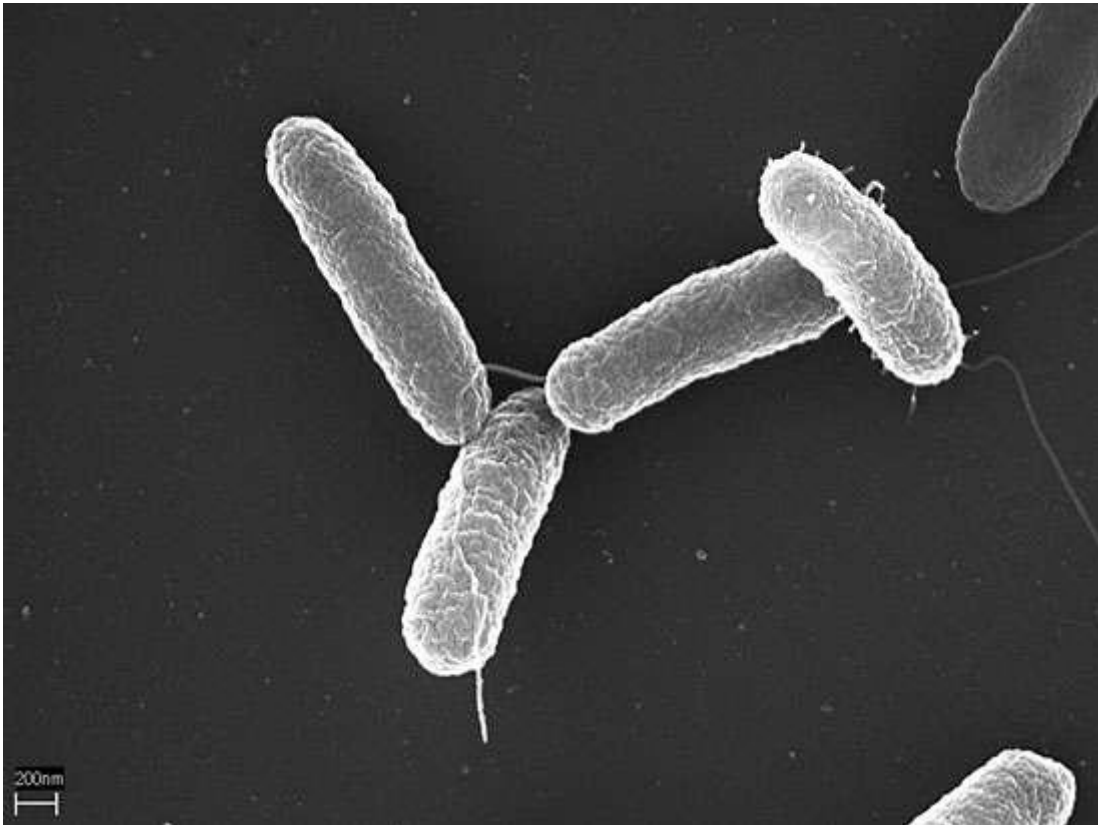


FIGURA 1. *Salmonella typhimurium*.

Volker Brinkmann, Instituto Max Plank de Biología de las Infecciones, Berlín. (5 de abril de 2005)

Una forma de abordar el problema de la salmonelosis, es controlar la concentración de este microorganismo en el tracto intestinal de los animales de granja. El transporte y sacrificio en el matadero de los animales de granja con elevadas cargas microbianas puede ayudar a la dispersión de los microorganismos patógenos a lo largo de la cadena alimentaria, comprometiendo la seguridad microbiológica de los alimentos y afectando como se ha comentado anteriormente a la salud del consumidor. En este sentido, la alimentación animal se ha convertido en un componente cada vez más crítico de la cadena alimentaria integrada. En 2010 se produjeron alrededor de 1000 Mt de piensos en todo el mundo y 150 Mt en la UE.

Parece que la introducción de ciertos cambios en estos piensos y sus prácticas de manejo podría incrementar la eliminación de patógenos por las heces. En este sentido se ha visto que la alimentación de ganado con dietas a base de cebada (Berg *et al.*, 2004) o de granos húmedos de destiladores (Wells *et al.*, 2009) aumentó el desprendimiento de *E. coli* O157: H7 en comparación con la alimentación de dietas estándar de maíz. En este contexto es muy interesante el uso de extractos naturales de plantas, aceites esenciales o algunos de sus componentes (Rebenhors, 1996; Misra *et al.*, 1997). Borsoi *et al.* (2011) mostraron que una mezcla de ácidos orgánicos y aceites esenciales fueron efectivos en la eliminación de *Salmonella enteritidis* por las heces en pollos infectados. De acuerdo a un documento interno de CRINA S.A, los aceites esenciales pueden considerarse una de las herramientas para que el nutricionista animal pueda formular alimentos para animales con cierta capacidad antimicrobiana. Aunque se debe realizar más investigación para comprender todos los mecanismos y capacidades de esas moléculas activas, no hay duda de que el rendimiento animal puede mejorarse a través de su uso. No obstante, la investigación con aceites esenciales de plantas ha arrojado resultados contradictorios, pero hay pruebas suficientes para sugerir que pueden tener un papel como una herramienta para combatir las enfermedades bacterianas en aves de corral. El tomillo, el orégano y el ajo parecen tener el mayor potencial (Griggs y Jacob, 2005). En consecuencia, parece que la alimentación animal puede tener un efecto importante en la transmisión de *Salmonella* repercutiendo en la salud humana, ya que la granja o confinamiento es el origen de los microorganismos introducidos en las canales durante el sacrificio y el aderezo.

En la actualidad, y como consecuencia de la intensa actividad de la industria agroalimentaria, se producen grandes cantidades de residuos en todo el mundo. Restos de hojas, tallos, frutos que no cumplen el estándar de calidad comercial, restos de pieles y pepitas, todos ellos generados como resultado de sus procesos de producción, con escaso o nulo valor económico para la empresa que los produce. Sin embargo, la eliminación de los subproductos agroalimentarios supone un sobrecoste para la empresa productora, así como un impacto negativo en el medio ambiente (O'Shea *et al.*, 2012). En la Unión Europea se producen, aproximadamente, un millón de toneladas de subproductos vegetales al año provenientes de la industria hortofrutícola (Stojceska *et al.*, 2008). Estos subproductos, obtenidos en grandes cantidades del procesado de vegetales y frutas, pueden resultar, sin embargo, interesantes por su composición. En este sentido, la revalorización de los subproductos de la agricultura y la industria alimentaria, se ha convertido en un eje prioritario de la Unión Europea (EUROSTAT, 2010) en apoyo al desarrollo sostenible. Trabajos de investigación diversos y recientes, profundizan en los objetivos de recuperar, revalorizar y/o reciclar estos subproductos. Así, se han desarrollado diferentes aplicaciones que permiten la revalorización de los

subproductos de la industria agroalimentaria para alimentación animal, fertilizantes, industria papelera, extracción de aceites esenciales y fragancias, compostaje, bioconversión, o su utilización como nuevos ingredientes en la formulación de nuevos productos (Kelbert *et al.*, 2015; Cañete-Rodríguez *et al.*, 2016; Marín *et al.*, 2015). En el caso de la formulación de nuevos productos con aplicación en industria alimentaria, los subproductos vegetales pueden ser revalorizados como fuente tanto de componentes de alto valor nutricional como de compuestos bioactivos que les confieren capacidad antioxidante, anticancerígena o antimicrobiana (Martin-Luengo *et al.*, 2011, Sanz-Puig *et al.*, 2015^a; Sanz-Puig *et al.*, 2015^b).

Los antimicrobianos naturales procedentes de plantas y animales están alcanzando gran popularidad como alternativa a los productos sintéticos. La actividad bioactiva la confiere, fundamentalmente, un grupo diverso de metabolitos secundarios de plantas que pueden variar en su estructura (variaciones en su anillo heterocíclico) y en su ruta biosintética (Azmir *et al.*, 2013). Los compuestos fenólicos presentes en las brassicas ejercen efectos protectores (Dekker *et al.*, 2000). Los flavonoides confieren a estos vegetales una importante capacidad antioxidante y antimicrobiana (Volden, 2009). Las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de estos vegetales pueden tener un impacto importante en el campo de los nutracéuticos y en la industria de procesado de alimentos y piensos (Cabello-Hurtado *et al.*, 2012; O'Shea *et al.*, 2012). Por otro lado, 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 bacterianas presentes usualmente en los animales (Errecalde, 2004).

Todo esto en su conjunto hace tremendamente atractivos a los extractos de estas plantas hasta tal punto que su revalorización es económicamente viable y atractiva (Djilas *et al.*, 2009), sobre todo para el sector nutracéutico y productor de piensos para animales, ayudando de esta manera a una economía circular.

Hay trabajos que han demostrado la eficacia de estos antimicrobianos naturales sobre distintos microorganismos patógenos (Tawema *et al.*, 2014; Sanz-Puig *et al.*, 2015) No obstante la inmensa mayoría de los estudios se han llevado a cabo *in vitro*, no se ha saltado aún esta barrera y apenas hay estudios *in vivo*. Sin embargo, los antimicrobianos naturales procedentes de plantas y animales se pueden considerar también como una estrategia más en conservación no térmica de alimentos y mitigación de enfermedades zoonóticas. No obstante, un campo apenas explorado es el de su uso como antimicrobianos en piensos para animales de granja con objeto de controlar los microorganismos zoonoóticos en el intestino de los animales, evitando de esta manera una dispersión excesiva durante el sacrificio. Hay que considerar que tanto la *Salmonella* como *Campylobacter* son la principal

causa de enfermedad de origen alimentario en Europa y que las principales fuentes son las aves y los cerdos. No se trata de una administración curativa para animales enfermos, se trata de reducir la carga microbiana del intestino de animales sanos mediante estos piensos bioactivos con capacidad antimicrobiana.

La enterobacteria *Salmonella* Typhimurium, generalmente considerada como un patógeno altamente adaptado con un estrecho rango de hospederos diana, no sólo puede producir problemas de salud en el hombre y animales, sino que también se ha visto que es capaz de infectar y reducir la esperanza de vida del nematodo *C. elegans* (Cardozo, 2017). Además, las cepas mutantes que exhiben una virulencia reducida en mamíferos también se atenuaron por su virulencia en *C. elegans*, lo que demuestra que el nematodo puede constituir un sistema modelo útil para el estudio de este importante patógeno humano *in vivo* (Labrousse *et al.*, 2000).

C. elegans, aunque a menudo mal caracterizado como un nematodo del suelo, se alimenta de microorganismos, principalmente de bacterias. (Félix y Braendle 2010; Frézal y Félix 2015). Coloniza hábitats ricos en microorganismos, pudiendo aislarse más fácilmente de la materia vegetal en descomposición como son las plantas y frutas en degradación que representan un amplio suministro de su fuente de alimento bacteriano (Barrière y Félix, 2014). En el laboratorio, los nematodos se cultivan normalmente en placas de agar que contienen un césped de la bacteria *Escherichia coli* OP50. Una vez que los gusanos agotan la bacteria, utilizan su suministro de grasa. Sin comida, se detiene el desarrollo de los gusanos jóvenes en estado de larva.

Además de ser un buen sistema para estudios genéticos, *C. elegans* tiene muchas ventajas inherentes como modelo para la biología eucariota. Estas características incluyen su tamaño pequeño, alta tasa reproductiva, facilidad de cultivo, bajo costo de mantenimiento, criopreservación a largo plazo, tiempo de generación rápido, transparencia, número de células invariables y desarrollo, y la capacidad de reducir la actividad de los genes utilizando la alimentación de ARNi. Aunque no se menciona generalmente, otra característica favorable de *C. elegans* es que los organismos no son nocivos para los humanos. De hecho, debido a que no pueden crecer a temperaturas corporales, no pueden crecer en humanos.

Algunos nematodos, por ejemplo, *Ascaris suum*, inducen una reacción alérgica debilitante y deben estudiarse en campanas ventiladas (Ahumada *et al.*, 2015). Hasta donde sabemos, las reacciones alérgicas a *C. elegans* no han sido documentadas.

C.elegans tiene una morfología cilíndrica y se encuentra organizado en sistemas: epitelial, alimentario, excretor, nervioso, muscular, cuticular, pericelular y reproductor. El sistema reproductor del hermafrodita de *C.elegans*, localizado en la parte central del nematodo, produce gametos maduros y proporciona el entorno adecuado para la fertilización y la puesta de huevos (Navarro González, 2015).

Los estudios de biología celular y del desarrollo que utilizan *C. elegans* se benefician en gran medida de la transparencia del animal, lo que permite a los investigadores examinar el desarrollo y los cambios debidos a mutaciones o entornos alterados a nivel de una única célula identificada dentro del contexto de la totalidad del organismo vivo. Por lo tanto, muchos problemas biológicos se pueden estudiar "en miniatura" a nivel de una sola célula, en lugar de grandes cantidades de células en tejidos heterogéneos.

La transparencia también permite una gran cantidad de estudios en animales vivos que utilizan como marcadores proteínas fluorescentes. La transparencia también significa que las herramientas optogenéticas, que alteran la actividad de las neuronas individuales, son particularmente efectivas en *C. elegans* (Husson *et al.*, 2013).

Adicionalmente, su elevada homología con los humanos (el 60-80% de los genes humanos tienen homólogo en *C. elegans*), su capacidad de revivir tras mantenerse congelados durante largos periodos de tiempo y de ser cultivado en un laboratorio en condiciones controladas y el potencial que ofrece para realizar ensayos genéticos con él, se ha convertido en uno de los organismos modelo más utilizado en investigación.

Dependiendo de la temperatura de crecimiento, en el estado adulto, el gusano es capaz de sobrevivir unos 10 a 15 días tras finalizar su etapa reproductiva que dura aproximadamente 65 h.

El final de cada estado larvario está determinado por un proceso de muda, en el cual se desprende la cutícula a medida que una nueva se sintetiza. La figura 2 representa los tiempos en los que tarda en desarrollarse el *C. elegans* desde el momento de la fertilización hasta que se convierte en adulto capaz de poner huevos durante unos 2-3 días a 22°C.

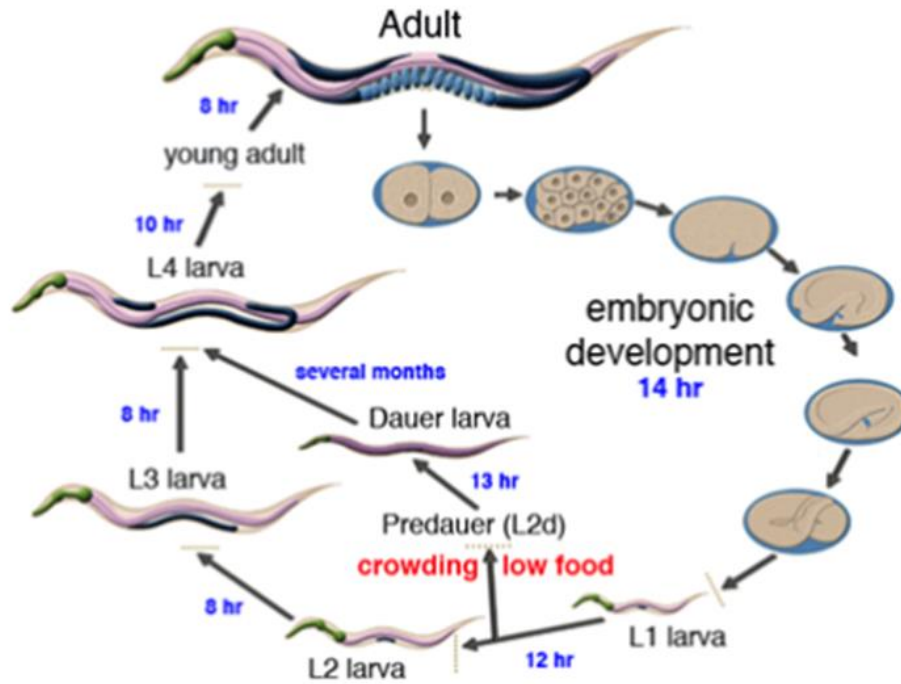


FIGURA 2. Esquema del ciclo de desarrollo de *C. elegans* (WORM ATLAS). L1: Estadío larvario; L2: Estadío larvario 2; L3: Estadío larvario 3; L4: Estadío larvario 4.

El núcleo de las células de *C. elegans* contiene 5 pares de cromosomas autosómicos (I-V) y 1 cromosoma sexual (X). Existen dos individuos en relación al sexo en *C. elegans*, el hermafrodita, que es el utilizado en este trabajo de investigación, capaz de auto-fertilizarse (XX), y el macho (XO), que sólo contiene una copia del cromosoma X y que se diferencia a partir del estadio L2 por la morfología de su cola. El ciclo de vida de *C. elegans* comprende diferentes estados: embrionario, larvario (de L1 a L4) y adulto, que se suceden durante los 3 primeros días del ciclo (WORMATLAS, Albert Einstein College of Medicine).

La temperatura afecta a los tiempos de muda y desarrollo de *C. elegans*, puesto que una temperatura superior (25°C) acelera el ciclo de vida de este nematodo, afectando también la cantidad de huevos que son capaces de autofertilizar y poner (unos 300 huevos a 20°C y unos 200 huevos a 25°C). Si en los estadios larvarios tempranos L1-L2 las condiciones ambientales no son favorables, *C. elegans* puede dar lugar a un estado de resistencia denominado "dauer", que se asemeja al estado de hibernación en los mamíferos, en el que puede sobrevivir varias semanas.

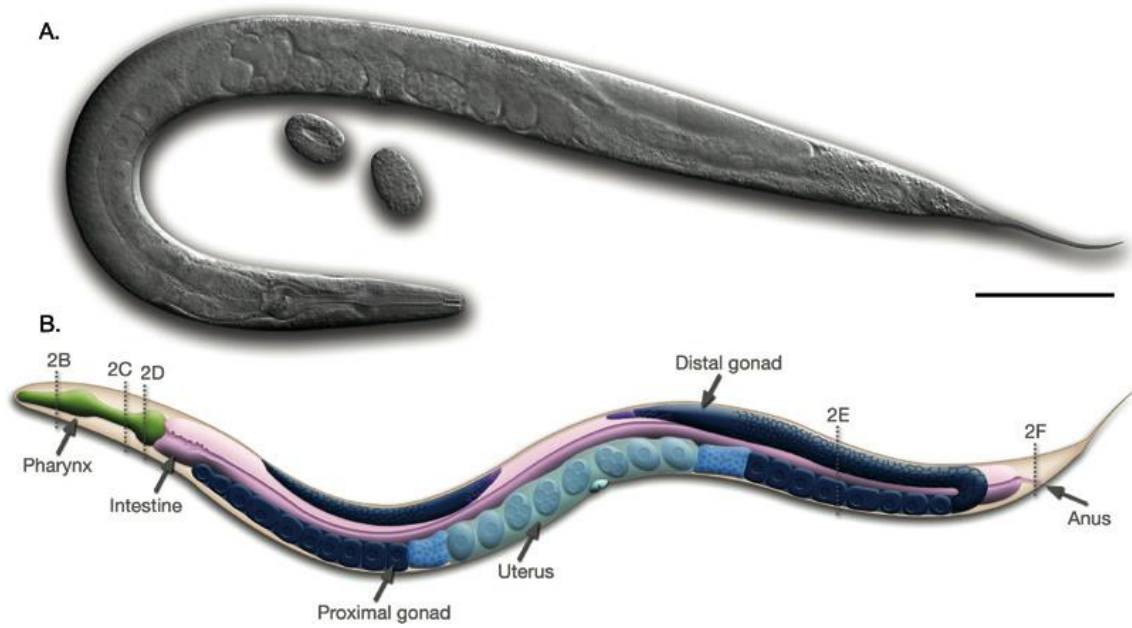


FIGURA 3. Representa la anatomía de una hermafrodita adulta.

A → Imagen de un hermafrodita adulta, lado lateral izquierdo.

B → Dibujo esquemático de las estructuras anatómicas, lado lateral izquierdo.

2. OBJETIVOS

El objetivo del estudio es caracterizar la evolución de la infección por *Salmonella* Typhimurium en *Caenorhabditis elegans* cuando el nematodo infectado se alimenta con un extracto de coliflor (*Brassica oleracea* var. botrytis).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación del cultivo de *Escherichia coli* OP50

Para la conservación de *E.coli* OP50 usada para alimentar al *C.elegans* durante todo el estudio realizado se prepararon 500 ml de medio LB (Luria Bernati) (Scharlab Chemie, Barcelona, España) y se inoculó con un vial de *E. coli* OP50 resuspendido en 5 ml del mismo medio. Se incubó en baño de agitación (Unitronic Orbital C 6001173, J.P.SELECTA.S.A) toda la noche a 37 °C, y se dividió en tubos Falcon de 50 ml estériles para someterlos a centrifugación a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C (centrífuga Beckman Avanti J-25). Los pellets de cada tubo se conservaron a -80°C después de eliminar sobrenadantes. Para la reactivación de cada tubo Falcon se resuspendieron en 5 ml de medio LB obteniendo una concentración 10⁸ UFC.

3.2. Preparación del cultivo de *Salmonella* Typhimurium

La cepa de *Salmonella* Typhimurium usada en el estudio pertenece a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 443).

Para preparar el cultivo de *Salmonella* Typhimurium, 500 ml de medio TSB (Tryptic Soy Broth) (Scharlab Chemie, Barcelona, España) se inocularon con una resuspensión de un vial de *Salmonella* Typhimurium (conservado a -80 °C) en 5 ml de medio TSB. Se prosiguió con la incubación en agitación del inóculo a 37 °C durante toda la noche. El inóculo se dividió en tubos Falcon de 50 ml estériles que se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C. Seguidamente, se descartaron sobrenadantes, y se conservaron a -80 °C hasta el momento de utilización. Para la reactivación del pellet de cada tubo, se añadieron 5 ml de medio TSB a cada tubo, obteniendo una concentración 10⁸ UFC.

3.3. Cultivo y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

Los nematodos se desarrollaron en medio Nematode Growth Media (NGM), el cual se preparó añadiendo 3 g de NaCl (Scharlab Chemie, Barcelona, España), 2,5 g de peptona (Peptona bacteriológica, Conda, España) y 17 g de agar bacteriológico (Scharlab Chemie, Barcelona, España) a 975 ml de agua destilada. Una vez esterilizado por autoclave y atemperado en baño (Baño 6000140, J.P. SELECTA. S.A), el medio fue suplementado con 1 ml de colesterol al 0,5% (Cholesterol 95% estabilizado, Acrós Organics, Belgium) preparado en etanol al 96% a partir de etanol absoluto Etanol

absoluto, Scharlau, Barcelona, España). Posteriormente, el colesterol al 0,5% fue esterilizado por filtración y vertido lentamente para evitar su precipitación. Al medio se añadieron también 1 ml de cloruro de calcio (1M), 1 ml de sulfato de magnesio (Magnesium Sulfate, 99% extra puro, Acrós Organics, Belgium) (1M) y 25 ml de tampón (1M). El tampón se elaboró añadiendo el volumen necesario de una solución de 25 ml de K₂HPO₄ (Potasio fosfato di-básico, Panreac, España) a 60 ml de una solución de KH₂PO₄ (Dihidrógeno fosfato potásico, MerckkgA, Alemania) hasta alcanzar pH 6 (pH meter GLP 21, Crison). Finalmente, el medio se homogeneizó y se sirvió en placas Petri grandes.

Para usar las placas sólidas como medio de mantenimiento de *C.elegans*, las placas se sembraron en superficie (asa de Digrafsky) con *E. coli* OP50, se incubaron a 37°C (Estufa Memmert, Schwabach, Alemania) durante toda la noche y se almacenaron a 4°C. También se emplearon placas pequeñas (60x15 mm) con NGM y césped de *E. coli* OP50 para el estudio del grupo control.

El cálculo de la cantidad de resuspensión utilizada para la realización del césped de *E.coli* OP50 o el de *Salmonella* Typhimurium, se realizó mediante la medida de absorbancia de dicha resuspensión (Espectofotómetro Lan Optics, Labolan). Una vez medida la absorbancia de la resuspensión, mediante una fórmula empírica extraída de investigaciones anteriores, se calculó el volumen necesario para la siembra de las placas Petri de menor tamaño (5 cm). Para la siembra en placas Petri grandes, se realizó una regla de tres según el diámetro (9 cm).

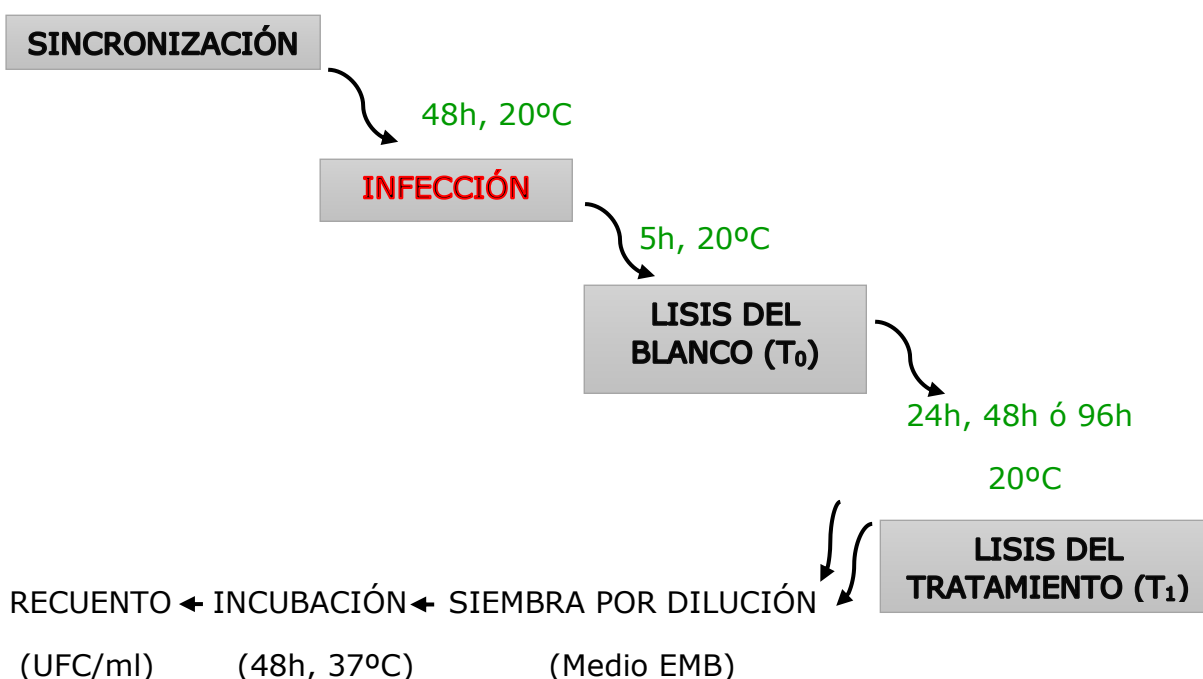
$$0.3 \text{ (nm)} * 30 \text{ (}\mu\text{l)} = \text{abs (nm)} * V \text{ (}\mu\text{l)}$$

Para mantener las condiciones óptimas del estudio, los nematodos se transfirieron cada 48 horas a placas nuevas con césped de *E. coli* OP50 selladas con parafilm y se incubaron a 20 ° C manteniendo así el stock de *C. elegans* sano.

3.4. Preparación de medio con infusión de *Brassica oleracea* var. *botrytis*

Para la preparación de infusión de coliflor al 3%, se llevó a ebullición agua peptonada al 0,1% (Scharlab Chemie, Barcelona, España), se añadió la cantidad de hojas de coliflor desecada correspondiente y se mantuvo 30 minutos en reposo y sin calentamiento adicional para la obtención de la infusión. Posteriormente, la infusión se repartió y centrifugó en tubos de 250 ml a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se reservaron en un matraz Erlenmeyer y, una vez que los pellets se filtraron al vacío con papel Wathman N°1 para eliminar sólidos que interfirieran con la preparación del medio de cultivo, se filtraron también los sobrenadantes. La infusión filtrada se esterilizó y se añadieron 3 g de NaCl, 2,5 g de peptona y 17 g de agar bacteriológico por cada 975 ml de infusión estéril. El medio NGM con coliflor atemperado se suplementó con 1 ml de colesterol al 0,5% preparado en etanol al 96% (esterilizado por filtración), 1 ml de cloruro de calcio (1M), 1 ml de sulfato de magnesio (1M) y 25 ml de solución buffer fosfato de potasio (1M). Antes de verter el medio en placas Petri 60x15 mm, éste se homogeneizó y se sirvieron 5 ml de medio por cada placa pequeña de 60x15 mm.

3.5. Procedimiento de trabajo



En esta investigación, se ha trabajado con *C.elegans* en estado adulto joven, ya que coincide con la época reproductiva del nematodo y su mayor puesta de huevos.

3.5.1. Sincronización de *Caenorhabditis elegans*

Con el fin de trabajar con poblaciones frescas de adultos jóvenes sincronizados para los estudios, cada semana se cultivaron 20 gusanos *C. elegans* (College of Biological Sciences, Minnesota University, USA,), en una placa de medio NGM con césped de *E. coli OP50* y se incubaron toda la noche a 20°C con el objetivo de conseguir una puesta de huevos al día siguiente. Llegado ése momento, se extrajeron los 20 gusanos dejando únicamente los huevos y las larvas y la placa se volvió a incubar durante 48h a 20° C. Después de este periodo, se obtuvo una población de adultos jóvenes sincronizados. La manipulación se realizó en ambiente estéril (mechero) con la ayuda de asa bacteriológica flameada y observación bajo microscopio estereoscópico binocular (XTX-3C, Comecta S.A. Abrera, Barcelona).

3.5.2. Infección de *C. elegans* con *Salmonella Typhimurium*

La infección de *C. elegans* consistió en transferir cada gusano adulto sincronizado (42 gusanos) a una placa de medio NGM con un césped de *Salmonella Typhimurium* durante 5 horas. Tras la exposición, una parte de los gusanos se extrajeron y se lisaron para contabilizar la cantidad de *Salmonella Typhimurium* inicial en esa población de nematodos, y el resto de gusanos se transfirieron a una placa de NGM con o sin adición del extracto de coliflor y con césped de *E. coli OP50* durante el tiempo requerido para llevar a cabo los estudios.

TABLA 1. Estudios a llevar a cabo con el *C. elegans*

Estudio	Descripción	Nomenclatura
1	<i>C. elegans</i> infectado con <i>Salmonella typhimurium</i> 5h, mantenimiento en medio NGM y alimentado con <i>E.coli OP50</i> . (<i>Grupo control</i>)	TS-NGM
2	<i>C. elegans</i> infectado con <i>Salmonella typhimurium</i> 5h, mantenimiento en medio NGM con infusión de coliflor al 3% y alimentado con <i>E.coli OP50</i> .	TS-NGM-COL

3.5.3 Lisis de *C.elegans*

Cada estudio consistirá en transferir individualmente los nematodos expuestos a *Salmonella* Typhimurium a placas con césped de *E.coli* OP50 y medio NGM ó NGM con infusión de coliflor al 3%. La lisis de los nematodos se realizará justo después del periodo de infección (t_0) y en el tiempo final a analizar, ($t_1=24h, 48h$ ó $96h$), es decir, lisis del blanco (t_0) y lisis del grupo control ó tratamiento ($t_1=24h, 48h$ ó $96h$). Se procederá a la siembra por dilución del lisado de *C.elegans*, incubación a 37° durante 48h en medio EMB y recuento de UFC de *Salmonella* Typhimurium en el intestino de *C.elegans*. Es necesario previamente sincronizar nematodos para obtener adultos jóvenes de la misma edad y proceder a 5h de infección de *C.elegans* con *Salmonella* Typhimurium tal como se describe en apartados anteriores.

Se realizaron 7 réplicas con 5 placas cada una (1gusano/placa) para t_0 (2 réplicas) y t_1 (5 réplicas) con el objetivo de afianzar la repetitividad del método. Con la finalidad de garantizar 5 réplicas y evitar pérdida de nematodos por muerte se infectó una placa de reserva por cada réplica.

Para la cuantificación de *Salmonella* Typhimurium y *E.coli* OP50 en el tracto digestivo de *C.elegans* se preparó un eppendorf estéril por cada réplica, cada uno con 1ml de medio M9 con Tritón X al 1% (Tritón™ X-100, Sigma-Aldrich, USA) y 5 perlas de vidrio estériles. Para preparar 100 ml de M9, se añadieron 10 μ l $CaCl_2$, 200 μ l de $MgSO_4$ y 2 ml de glucosa al 20% (Glucosa anhidra, Scharlau, Barcelona, España) a 78ml de agua estéril..Para la elaboración de 10 ml de medio M9 con Tritón X al 1%, 100 μ l de tritón X se adicionaron a 9.9 ml de M9.

Cada réplica consistió en 1 eppendorf al cual se traspasaron 5 gusanos jóvenes infectados a t_0 ó infectados y procedentes del grupo control ó del tratamiento con coliflor (t_1), previamente lavados dos veces en placas de medio NGM con 10 μ l de medio M9. El lavado se llevó a cabo con la finalidad de eliminar residuos de la superficie externa del gusano. Seguidamente, los eppendorf se llevaron a agitación en vórtex para lisar los nematodos y se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) de serie A y B por duplicado. Dichas diluciones se realizaron en eppendorf con 900 μ l de agua de peptona 0,1% y se sembraron por dilución en medio EMB, medio selectivo y diferencial para bacterias Gram negativas.

Las placas sembradas se dejaron solidificar y se incubaron a $37^\circ C$ en estufa (Memmert®, Schwabach, Alemania) durante 48h, momento en el que se contaron las colonias presuntivas de *Salmonella* Typhimurium (UFC) procedentes del tracto digestivo de *C.elegans* a t_0 ó t_1 .

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se lleva a cabo con Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., EE.UU.). Se compararon los datos obtenidos para el tratamiento sin coliflor (TS-NGM) con los obtenidos para el tratamiento con coliflor (TS-NGM-COL) teniendo en cuenta los distintos tiempos de tratamiento, 24, 48 y 96 horas. Para ello, se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes. El p-valor de la prueba-F en la tabla ANOVA determinó si había diferencias significativas entre las medias de UFC/ml de *Salmonella* del grupo control y del tratamiento con coliflor. Además, las pruebas de rangos múltiples establecieron, dentro del mismo grupo, a qué tiempos eran significativamente diferentes las medias de concentración de *Salmonella*, apareciendo o no diferencias estadísticamente significativas, es decir, p valor $\leq 0,05$ ó p valor $> 0,05$ respectivamente con un nivel de confianza del 95,0%.

Las gráficas se realizaron en Microsoft® Excel 2013 versión 15.0.4805.1003, en las que se comparan el número de colonias de *Salmonella* Typhimurium presentes en el interior de los gusanos que son lisados (Log (N/N₀), frente al tiempo de exposición de cada estudio.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Efecto de la infección por *Salmonella* Typhimurium en *C.elegans*.

El primer estudio consistió en conseguir la infección por *Salmonella* Typhimurium durante 5 horas en *C.elegans* y analizar posteriormente la evolución de la infección alimentando al nematodo en medio NGM con un césped de *E.coli* durante 24h, 48h, ó 96h a 20°C.

La figura 4 muestra la evolución a lo largo del tiempo de la *Salmonella* en el intestino del *C.elegans* infectado previamente durante cinco horas alimentándolo con *Salmonella*.

Tal y como se puede apreciar en dicha figura, a tiempo 24 horas el número de *Salmonella* presentes en el intestino de *C.elegans* previamente infectado aumenta. A las 48 horas se produce una reducción del número de microorganismos que hay en el intestino del nematodo. Esto podría indicar una reacción defensiva del nematodo frente a la *Salmonella* (Ziegler K y Pujol N, 2009). No obstante, a partir de las 48 horas, la concentración de

Salmonella en el intestino del nematodo se mantiene constante a lo largo del tiempo, observándose un ligero aumento a las 96 horas.

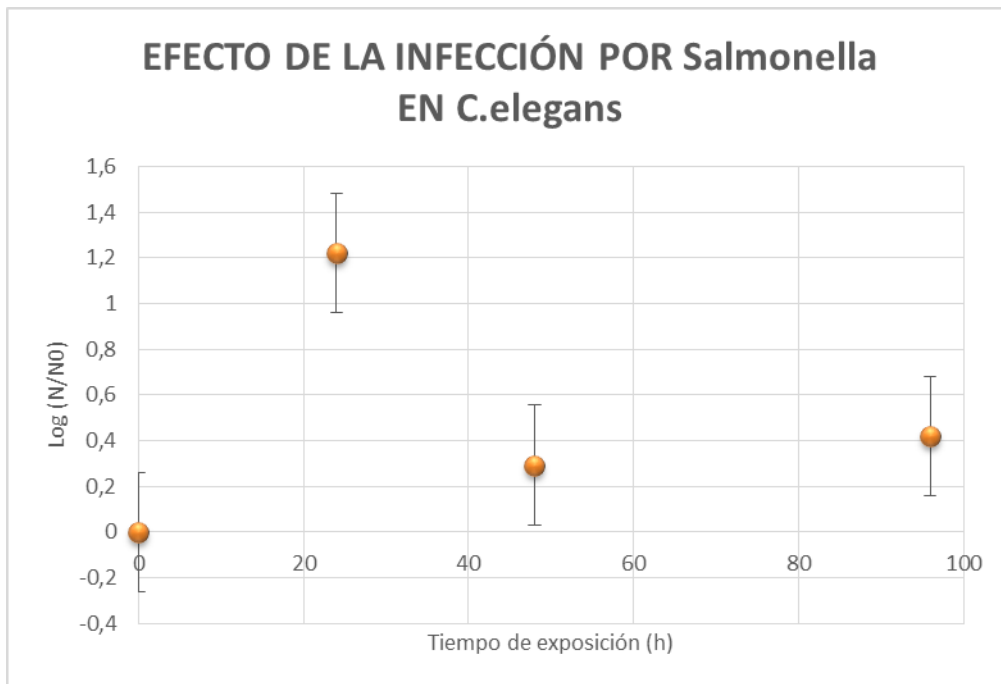


FIGURA 4. Evolución de la supervivencia de *Salmonella* en el intestino de *C. elegans* infectado con *Salmonella* y alimentado en medio NGM con un césped de *E. coli* OP50.

En la tabla 2, se pueden apreciar los resultados del análisis de la varianza que expresa cuáles son los grupos homogéneos y por tanto sin diferencias significativas y cuáles son los grupos no homogéneos que se diferencian significativamente del resto. Se ha comparado el número de microorganismos presentes en el intestino del nematodo a lo largo del tiempo (24, 48 y 96 horas). Como se aprecia en la tabla, no hay diferencias significativas en la concentración de *Salmonella* presente en el intestino del nematodo a las 48 y 96 horas ($p > 0,05$). Sí se observan diferencias significativas, ($p \leq 0,05$) de acuerdo a la homogeneidad de grupos de la tabla 2, entre 24 horas y el resto de los tiempos.

TABLA 2. Análisis de la varianza de la evolución de la concentración de *Salmonella* en el intestino del *C.elegans* previamente infectado con dicho microorganismo.

Tiempo de muestreo	Media de los recuentos UFC/mL	Grupos homogéneos
48	3425	X
96	4731	X
24	29675	X

5.2. Efecto de la alimentación del *C. elegans* con extracto de coliflor sobre la concentración de *Salmonella* en el intestino del nematodo.

En este segundo estudio, se repitió la metodología usada en el estudio anterior, con la diferencia de que el nematodo infectado se alimentó en el medio NGM que contenía extracto de coliflor y un césped de *E. coli* OP50.

La figura 5 muestra la evolución de la concentración de *Salmonella* en el intestino de *C.elegans* previamente infectado con dicho microorganismo cuando el nematodo se alimenta en NGM con coliflor y un césped de *E.coli* OP50. Como se observa en dicha figura, se produce un aumento de la concentración de *Salmonella* en el intestino del *C.elegans* al cabo de las 24 horas después de la infección. Sin embargo, éste aumento es menor al observado cuando el nematodo infectado no se alimenta con NGM más extracto de coliflor (Figura 4). Este comportamiento parece indicar que la presencia de extracto de coliflor, podría ayudar al nematodo en su reacción defensiva frente al patógeno. También se observa, que transcurridas las 24 horas, a las 48 y 96 horas, se produce una disminución drástica en el número de microorganismos del intestino del nematodo (del orden de dos ciclos logarítmicos). Esto puede indicar un efecto antimicrobiano del extracto de coliflor y/o una mejor defensa del nematodo frente al patógeno como consecuencia del consumo del extracto de coliflor que es rico en polifenoles y con capacidad antioxidante (Wilson, *et al*, 2011).

La capacidad antimicrobiana de la familia Brassicaceae se ha demostrado con anterioridad (Brandi *et al.*, 2005, Wilson *et al*, 2011). Cuando los microorganismos existentes en un alimento se exponen a elementos que alteran sus estructuras celulares y/o sus funciones fisiológicas, se produce su inactivación. El uso de antimicrobianos naturales que causan la inactivación microbiana, sigue siendo objeto de estudio en la actualidad, ya que se ha observado que en algunos casos puede causar ciertas

resistencias, en lugar de producir la muerte bacteriana. Por ello, al utilizar estas nuevas tecnologías es necesario utilizar las condiciones adecuadas para inactivar a los microorganismos más resistentes previniendo al máximo la aparición de adaptaciones (Arana *et al.*, 2016).

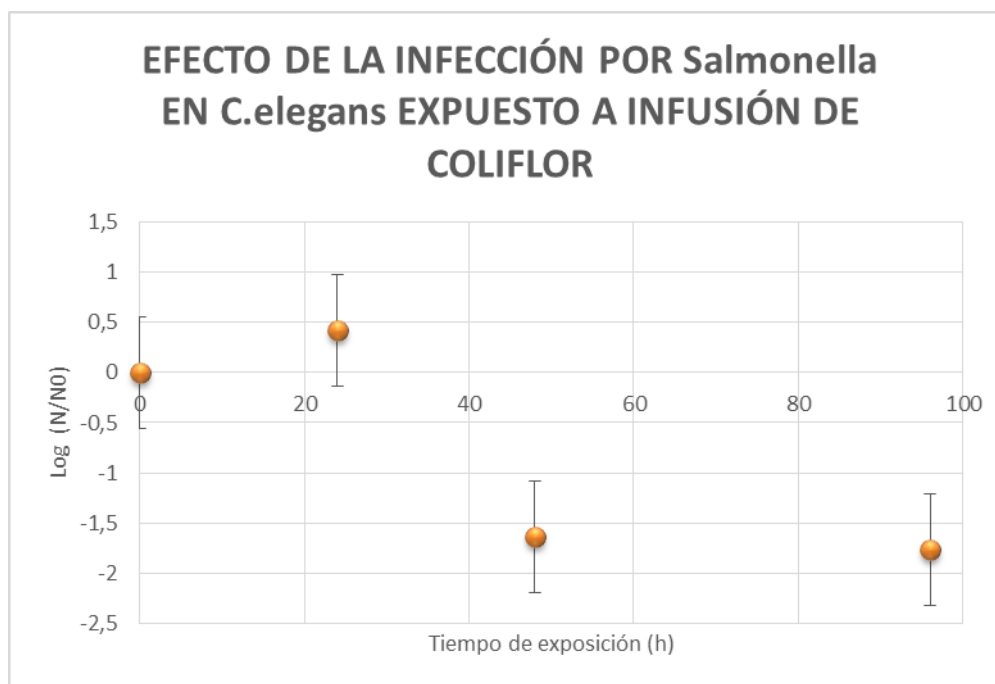


FIGURA 5. Evolución de la supervivencia de *Salmonella Typhimurium* en el intestino de *C. elegans* infectado con *Salmonella* y alimentado en medio NGM conteniendo extracto de coliflor y un césped de *E. coli* OP50.

En la tabla 3, se pueden apreciar los resultados del análisis de la varianza para los resultados en presencia de extracto de coliflor en el medio de alimentación del nematodo. En esta Anova, se compara el número de microorganismo presentes en el intestino del nematodo a lo largo del tiempo (24, 48 y 96 horas). Como se aprecia en la tabla de homogeneidad entre grupos, no hay diferencias significativas en la concentración del patógeno presentes en el intestino del nematodo a las 48 y 96 horas ($p > 0,05$). Pero sin embargo, se observan diferencias significativas, ($p \leq 0,05$), entre 24 horas y el resto de los tiempos.

TABLA 3. Análisis de la varianza de la evolución de las concentraciones de *Salmonella* en el estudio 2 (con coliflor) según el tiempo de exposición.

Tiempo de muestreo	Media de los recuentos UFC/mL	Grupos homogéneos
48	47.5	X
96	84.1	X
24	5243.75	X

5.3. Comparación de la evolución de la infección por *Salmonella typhimurium* en el *C. elegans* alimentado sin y con extracto de coliflor.

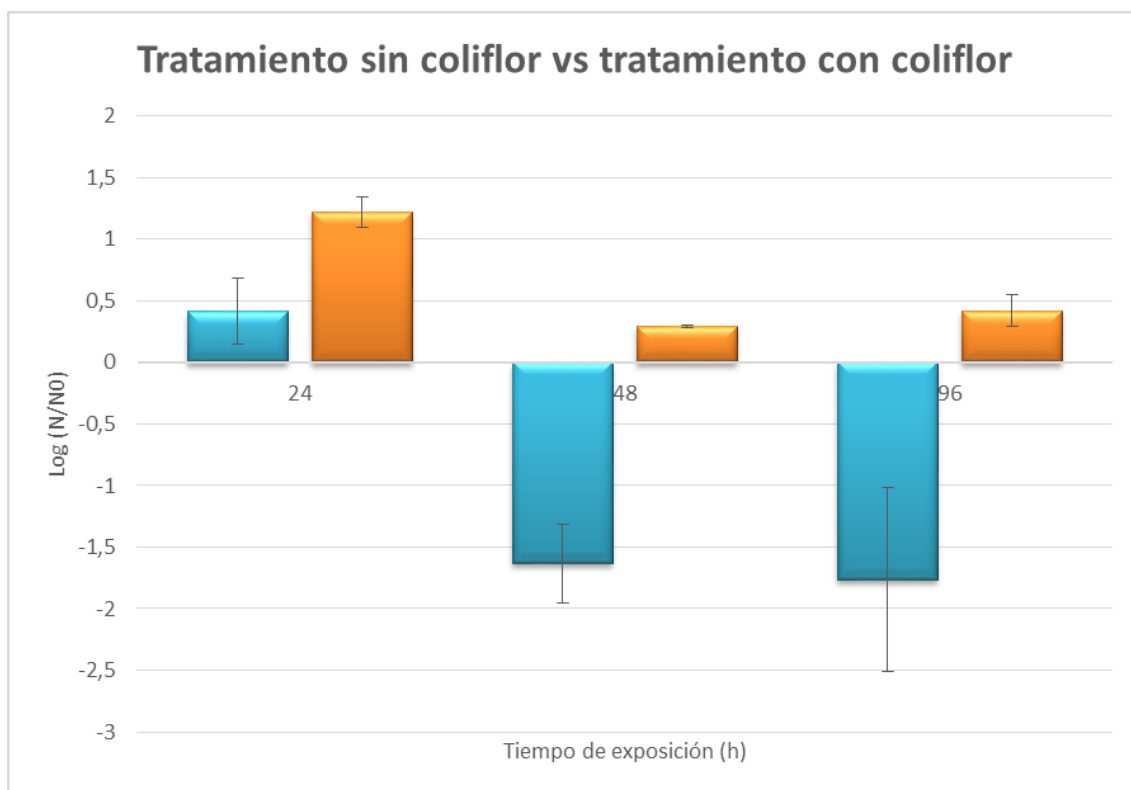
En la figura 6 se puede apreciar la comparación entre la evolución de la infección por *Salmonella* en el intestino del nematodo alimentado con y sin coliflor.

En general, se observa que la presencia de extracto de coliflor en el medio de alimentación del nematodo no sólo controla la concentración del microorganismo patógeno en el intestino del nematodo si no que con el tiempo se produce la muerte de dicho microorganismo.

La figura muestra un incremento de la concentración de *Salmonella* en el interior de *C.elegans* infectado a las 24h, independientemente de la exposición o no a la infusión de coliflor. No obstante, se observa que la concentración de *Salmonella* es inferior a cuando el nematodo no se alimenta en presencia de extracto de coliflor. Esta diferencia en la concentración del patógeno es de más de medio ciclo logarítmico en *C.elegans* alimentado durante 24h en presencia de extracto de coliflor con respecto al grupo que no incluía dicho extracto en su alimento para el mismo tiempo. La tendencia decreciente comienza a las 48h, momento en el cual la concentración de *Salmonella* se reduce casi dos ciclos logarítmicos en los nematodos alimentados con extracto de coliflor, respecto del grupo no alimentado con extracto de coliflor. Esto podría significar que algún/os componente/s de la infusión de coliflor podrían ayudar al nematodo a sobreponerse a la infección y así seguir con su ciclo de vida normal.

A las 96h se observa un mantenimiento de la tendencia descendente en los nematodos alimentados con extracto de coliflor, con reducción significativa de la concentración de *Salmonella* con respecto a *C.elegans* no alimentado con dicho extracto. Sin embargo, la concentración de *Salmonella* en el grupo no alimentado con coliflor experimenta un ligero aumento inferior a medio ciclo logarítmico en comparación con el valor de concentración de

patógeno a las 48h. De cualquier forma, la reducción y el ligero aumento en la concentración de *Salmonella* mencionados no son estadísticamente distintos a los obtenidos a las 48h, en ninguno de los grupos estudiados respectivamente ($p > 0,05$).



- Alimentado SIN Coliflor (TS-NGM)
- Alimentado CON Coliflor (TS-NGM-COL)

FIGURA 6. Comparación de la concentración de *Salmonella* Typhimurium en el intestino de *C.elegans* en grupos de tratamiento expuestos y no expuestos al extracto de coliflor a distintos tiempos (24h, 48h y 96h).

La tabla 4 muestra el resumen del análisis de la varianza que se obtiene al comparar los efectos con y sin extracto de coliflor. Dado que el p-valor en todos los casos es $\leq 0,05$, podemos decir que hay diferencias significativas entre los dos efectos para cualquiera de los tiempos en los que se han tomado muestras.

TABLA 4. Estadísticos del análisis de la varianza (F-ratio y p-valor) obtenidos entre los grupos de nematodos alimentados y no alimentados con extracto de coliflor a lo largo del tiempo (24h, 48h y 96h).

Tiempo de muestreo (horas)	F-ratio	*p-valor
24	30.41	0.0053
48	3208.6	0.0000
96	125.06	0.0000

*P-valor ≤ 0.05 indica que los efectos entre el grupo de nematodos alimentados con extracto de coliflor y sin extracto son significativamente diferentes con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis de la varianza de los resultados pertenecientes a los dos estudios nos lleva a poder plantear que el extracto de coliflor puede tener propiedades antimicrobianas que ayuden a la reducción y eliminación de *Salmonella* Typhimurium en el nematodo. Este hecho, sería de gran aplicación en la fabricación de piensos de animales y su posterior comercialización, ya que sabemos que la *Salmonella* es un microorganismo muy abundante en los alimentos de origen animal como la carne de ave o los huevos y que, además, son de los alimentos más consumidos por la población española. Así, se contribuiría a un sistema de comercialización más seguro desde el punto de seguridad alimentaria.

La coliflor, perteneciente a la familia *Brassicaceae*, contiene compuestos bioactivos como carotenoides, flavonoides, vitamina C, minerales, polifenoles y glucosinolatos en cantidad considerable (Bhandari y Kwak, 2015; Bellostas *et al.*, 2007; Nilsson *et al.*, 2006). Algunas propiedades atribuidas a la coliflor son capacidad antioxidante, anticancerígena y preventiva de enfermedades cardiovasculares (Manchali *et al.*, 2012; Sanz-Puig *et al.*, 2015).

Sanz-Puig (2017) evaluó el efecto antimicrobiano de subproductos vegetales que procedían de la materia prima de brócoli, coliflor y soja. Los microorganismos patógenos se sometieron a extractos acuosos de estos subproductos y se demostró mayor capacidad bactericida en subproductos de coliflor y mandarina frente a Gram positivos (*L. monocytogenes* y *B. cereus*) y Gram negativos (*S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7) a lo largo del tiempo con temperaturas de crecimiento óptimas para cada microorganismo. La excepción fue *L. monocytogenes*, bacteria Gram-positiva no afectada por la exposición a dichos extractos de subproductos vegetales. En concreto, *Salmonella* Typhimurium resultó ser el patógeno

alimentario más sensible al efecto antimicrobiano, con un efecto bactericida máximo próximo a 5 ciclos logarítmicos de inactivación tras la exposición del microorganismo a infusión de coliflor al 10% a 10°C durante 4,5 días. El análisis de la composición de coliflor y la mandarina coincidieron en un alto contenido en polifenoles. Este hallazgo condujo a postular que, de forma general, podría existir relación entre el perfil polifenólico con la capacidad antimicrobiana, apoyado por estudios anteriores (O'Shea *et al* 2012, Xie *et al.*, 2017). Aun cuando el contenido polifenólico fue mayor en los subproductos deshidratados brutos, el efecto bactericida de las infusiones en caliente mejoró en comparación con el obtenido de los subproductos deshidratados en iguales condiciones de incubación. Por tanto, por el alto contenido en polifenoles a los que se les atribuye un importante papel antioxidante, la coliflor muestra también capacidad bactericida contra los patógenos transmitidos por los alimentos aunque otros componentes de éste vegetal podrían estar contribuyendo a esta acción bactericida.

Estudios anteriores sobre la tasa de supervivencia por unidad de tiempo del *C. elegans* llevados a cabo *in vivo* demostraron que la virulencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (CECT 443) disminuía al exponerla a infusión de coliflor al 5% repetidas veces y que los efectos nocivos de dicho microorganismo en *C.elegans* disminuían en comparación con su grupo control (*Salmonella* sin tratar con extracto de coliflor), incrementándose así la probabilidad de supervivencia del nematodo a los 2, 12 y 22 días . En concreto, la máxima diferencia en la probabilidad de supervivencia entre grupos se observó a los 12 días, con un valor de 0.26 para el grupo expuesto a coliflor respecto a 0.12 del grupo control (Sanz-Puig *et al.*, 2017) .Estos hallazgos refuerzan los resultados presentados en este trabajo respecto al efecto del extracto de coliflor sobre *Salmonella* en el intestino del nematodo.

6. CONCLUSIONES

En conclusión, podemos decir que tras el estudio realizado en el que se pudo evaluar el efecto que el extracto de coliflor tiene sobre la contaminación de *Salmonella* en el intestino de *C. elegans*, se abre una puerta a la utilización de éstos extractos procedentes de residuos de la agroindustria en la elaboración de piensos para animales, ya que como se ha demostrado en el trabajo, se puede llegar a controlar e incluso a reducir la concentración de un microorganismo patógeno que esté contaminando el intestino del animal. No obstante, estos estudios deberían complementarse con un estudio de campo utilizando animales de granja con objeto de optimizar la incorporación de estos extractos con capacidad antimicrobiana, adaptándolo a las necesidades de cada grupo de animales (pollos, cerdos).

Por otro lado, el uso de estos residuos de la agroindustria para la obtención de los extractos vegetales, va hacia el desarrollo de una agricultura sostenible, además de la posible revalorización económica de dichos residuos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta Malucín, R. F. (2007). La manipulación de chorizo y su contaminación microbiana en el mercado modelo de la ciudad de Ambato. Obtenido de Repositorio Universidad Técnica de Ambato: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/3152>

Ahumada, V., Garcia, E., Dennis, R., Rojas, M. X., Rondon, M. A., Perez, A., Penaranda, A., Barragan, A. M., Jimenez, S., Kennedy, M. W. & Caraballo, L. (2015). IgE responses to Ascaris and mite tropomyosins are risk factors for asthma. Clin Exp Allergy 45: 1189-1200.

Altekruse S.F., N.J. Stern, P.I. Fields, D.L. Swerdlow. (2000). Campylobacter jejuni an emerging foodborne pathogen. Emerging Infectious Diseases, 5: 28-35

Arana Lozano A. (2016). Estudio de los cambios de virulencia en Salmonella Typhimurium tratada con extracto de coliflor mediante el uso de Caenorhabditis elegans como organism modelo. (Tesis de maestría) Universidad Politécnica de Valencia.

Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M.

(2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 4, 426-436

Barrière, A. and Félix, M.A. (2014). Isolation of *C. elegans* and related nematodes. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19764/>

Bello-Pérez, L., Ortiz-Dillanes, D., Pérez-Memije, E., & Castro-Domínguez, V. (1990). Salmonella en carnes crudas: un estudio en localidades del estado de Guerrero. *Salud Pública de México*, 74-79.

Bellostas, N.; Kahlicki, P.; Sorensen, J.C.; Sorensen, H. Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Sci. Hortic.* 2007, 114, 234–242.

Berg, J., T. McAllister, S. Bach, R. Stiborn, D. Hancock, and J. LeJeune. (2004). *Escherichia coli* O157:H7 excretion by commercial feedlot cattle fed either barley- or corn-based finishing diets. *Journal of Food Protection*. 67:666–671

Bhandari, S.R. y Kwak, J.H. (2015). Chemical composition and antioxidant activity in different tissues of Brassica vegetables. *Molecules*, 20, 1228–1243.

Borsoi AL.R., Diniz G.S, Salle CTP, Moraes HLS y Nascimento VP (2011) Salmonella fecal excretion control in broilers chickens by organic acid and essential oil blend feed added. *Brazilian Journal of Poultry Science* 13/1: 65-69.

Brandi, G.; Amagliani, G.; Schiavano, G.F.; De Santi, M.; Sisti, M. (2005). Activity of Brassica oleracea Leaf Juice on Foodborne Pathogenic Bacteria.

Cabello-Hurtado, F., Gicquel, M., Esnault, M.A. (2012). Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective. *Food Chemistry*, 132, 2, 1003-1009

Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Ehrenreich, A., Liebl, W., García-García, I. (2016). Gluconic acid: Properties, production methods and applications – An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. *Process Biochemistry*, 51, 12, 1891-1903.

Cardozo Guzman, M.C. (2017). Evaluación de la infección de *Caenorhabditis elegans* por *Salmonella typhimurium* mediante la alimentación con una infusión de *Brassica oleracea botrytis*. (Tesis de maestría). Universidad Politécnica de Valencia.

Castro Domínguez, A. (2008). Enfermedades transmitidas por alimentos. . La Habana: Editorial de Ciencias Médicas.

Center for Food Safety and Applied Nutrition, of the Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services. (2012). *Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. 2nd Edition.

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

Dekker, M., Verkerk, R.E., Jongen, W.M.F. (2000). Predictive modeling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolates in cabbage. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 174-181

Dirección General de Epidemiología. (29 de Agosto de 2015). Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Obtenido de Boletín Epidemiológico (Lima):

<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2015/34.pdf>

Djilas, S. (2009). By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 15, 4, 191-202 9

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. (*EFSA Journal* 2016; 14(12):4634, 231, 231 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634)

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017. The e European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. (*EFSA Journal* 2017; 15(2):4694,212 pp.doi:10.2903/j.efsa.2017.4694)

Errecalde J. O. (2004) *Uso de antimicrobianos en animales de consumo*. FAO PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL. ISBN 92-5-305150-7

European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*. (2014); 12(2):3547-859.

EUROSTAT data. Preparatory study on food waste across EU 27. October (2010). European Commission (DG ENV). Disponible en: http://ec.europa.eu/environment/eussd/pdf/bio_foodwaste_report.pdf

Félix MA, Braendle C. 2010. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 20: R965-R969.

- Frézal L, Félix MA. 2015. *C. elegans* outside the Petri dish. *eLIFE* 4: e05849.
- Griggs J. P and P and Jacob J. P.(. (2005) Alternatives to Antibiotics for Organic Poultry Production. *Journal of Applied Poultry Research*. 14:750–756.
- Husson, S.J, Gottschalk, A and Leifer, A, M. (2013). Optogenetic manipulation of neural activity in *C. elegans*: From synapse to circuits and behavior.
- Kelbert, M., Romani, A., Coelho, E., Pereira, F.B., Teixeira, J.A., Domingues, L. (2015). Lignocellulosic bioethanol production with revalorization of low-cost agroindustrial by-products as nutritional supplements. *Industrial Crops and Products*, 64, 16-24
- Labrousse, A.; Chauvet, S.; Couillault, C.; Kurz, C.L.; Ewbank, J.J. (2000). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Current Biology*, 10, 1543-1545.
- Manchali S, Chidambara Murthy KN, Patil BS. Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *J Funct Foods*. Elsevier Ltd; 2012; 4(1):94–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.08.004>
- Marín, D.C., Vecchio, A., Ludueña, L.N., Fasce, D., Alvarez, V.A., Stefani, P.M. (2015). Revalorization of Rice Husk Waste as a Source of Cellulose and Silica. *Fibers and Polymers*, 16, 2, 285-293
- Martín-Luengo, M.A., Yates, M., Diaz, M., Saez Rojo, E., Gonzalez Gil, L. (2011). Renewable fine chemicals from rice and citric subproducts: Ecomaterials. *Applied catalysis b: Environmental*, 106, 488-493
- Misra, G., and Pavlostathis, S.G. (1997). Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and soil slurry systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 572-577
- Navarro González, M.C. (2015). *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo para estudiar enfermedades mitocondriales asociadas a defectos en la modificación del TRNA. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia.
- Nilsson, J.; Olsson, K.; Engqvist, G.; Ekvall, J.; Olsson, M.; Nyman, M.; Akesson, B. Variation in the content of glucosinolates, hydrocinnamic acids, carotenoids, total antioxidant capacity and low-molecular-weight carbohydrates in Brassica vegetables. *J. Sci. Food Agric*. 2006, 86, 528–538.
- O’Shea, N., Arendt, E.K., Gallagher, E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their

applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 1–10

OMS. (Diciembre de 2015). Inocuidad de los alimentos. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>

Rebenhors J. (1996). Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with *Pseudomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:470-474.

Rodríguez, K y Silva, B (2017). Incidencia de la salmonelosis por contaminación de cárnicos en la zona de planificación 4. (Tesis de posgrado). Universidad Estatal de Milagro, facultad de ciencias de la salud.

Sanz-Puig, M. (2017). Valorización de subproductos de la industria alimentaria como antimicrobianos naturales frente a microorganismos patógenos mediante tecnologías no térmicas de conservación (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia.

Sanz-Puig, M.; Pina-Pérez, M.C.; Criado, M.N.; Rodrigo, D.; Martínez-López, A. (2015a) Antimicrobial potential of cauliflower, broccoli, and okara byproducts against foodborne bacteria *Foodborne Pathogens and Disease* vol. 12, nº 1, págs. 39-46

Sanz-Puig, M., Pina-Pérez, M.C., Rodrigo, D., Martínez.López, A. (2015b). Antimicrobial activity of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *bBotrytis*) by-product against *Listeria monocytogenes* *Food Control*, 50, 435-440.

Stojceska, V., Ainsworth, P., Plunkett, A., Ibanoglu, E., Ibanoglu, S. (2008). Cauliflower by-products as a new source of dietary fibre, antioxidants and proteins in cereal based ready-to-eat expanded snacks. *Journal of Food Engineering*, 87, 554-563

Tawema, P., Han, J., Salmieri, S., Lacroix, M. (2014). Application of Selected Natural Antimicrobial Formulations for the Control of Food Pathogens in Fresh-Cut Cauliflower. *Researchgate*

Volden, J., Bengtsson, G.B., Wicklund, T. (2009). Glucosinolates, L-ascorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *Botrytis*) effects of long-term freezer storage. *Food Chemistry*, 112, 967-976 09

Wells, J. E., S. D. Shackelford, E. D. Berry, N. Kalchayanand, M. N. Guerini, V. H. Varel, T. M. Arthur, J. M. Bosilevac, H. C. Freetly, T. L. Wheeler, C. L. Ferrell, and M. Koohmaraie. (2009). Prevalence and level of *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides of feedlot steers fed diets with or without wet distillers grains with soluble. *Journal of Food Protection*. 72:1624–1633

Wilson, A.E.; Bergaentzlé, M.; Bindler, F.; Marchioni, E.; Lintz, A. 2011. In vitro efficacies of various isothiocyanates from cruciferous vegetables as

antimicrobial agents against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, 30, 318-324.

Wormatlas, NIH Division of Research Resources for the Center for Anatomical Studies of *C. elegans* (internet). Introduction to *C. elegans* anatomy. *Caenorhabditis elegans* as a genetic organism: <http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>

Xie, Y., Chen, J., Xiao, A., and Liu, L. (2017). Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition. *Researchgate* 22(11):1913

Ziegler, K y Pujol, N. (2009). *C. elegans* defence mechanisms. *Med Sci (Paris)*. 25 (5): 497-503.