

ÍNDICE

I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA	3
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	9
II.1 Importancia de la inocuidad alimentaria. Patógenos alimentarios	9
II.2 Agroindustria, impacto medioambiental y economía circular	14
II.3 Sustancias naturales antimicrobianas	20
II.3.1 Antimicrobianos naturales procedentes de vegetales	22
II.3.1.1 Potencial antimicrobiano de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (coliflor)	26
II.3.2 Antimicrobianos naturales procedentes de animales	28
II.3.2.1 Acción antimicrobiana del quitosano	31
II.3.3 Antimicrobianos naturales procedentes de cianobacterias	35
II.3.3.1 Acción antimicrobiana de <i>Arthrospira</i> spp. (<i>Spirulina</i> spp.).....	37
II.4 Métodos para determinar la capacidad antimicrobiana	39
II.4.1 <i>In vitro</i>	39
II.4.2 <i>In vivo</i>	42
II.5 Uso de <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>) como organismo modelo	44
II.5.1 Fisiología y ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	45
II.6 Aplicación de la Alta Presión Hidrostática (HHP) en el campo alimentario: tecnología de barreras	49

III. OBJETIVOS	55
IV. PLAN DE TRABAJO	61
V. MATERIALES Y MÉTODOS	69
V.1 Preparación de las sustancias naturales del estudio	69
V.2 Protocolos de reactivación y crecimiento de cepas microbianas	70
V.3 Técnicas generales de manipulación de <i>C. elegans</i>	71
V.3.1 Cultivo y mantenimiento de <i>C. elegans</i> en medio Nematode Growth Media (NGM)	71
V.3.2 Preparación de cultivo bacteriano como alimento de <i>C. elegans</i> en placa	72
V.3.3 Sincronización de <i>C. elegans</i>	73
V.3.4 Estudios de supervivencia y esperanza de vida	73
V.3.5 Estudios de puesta de huevos	74
V.4 Materiales y métodos para determinar la capacidad antimicrobiana <i>in vivo</i>	74
V.4.1 Evaluación del efecto de las sustancias naturales sobre <i>C. elegans</i>	75
V.4.1.1 Preparación de medio NGM con las diferentes sustancias naturales	75
V.4.1.2 Grupos de estudio	76
V.4.2 Determinación de la capacidad antimicrobiana <i>in vivo</i>	77
V.4.2.1 Estudios de supervivencia y esperanza de vida para determinar la capacidad antimicrobiana	77
V.4.2.2 Estudios de lisis de <i>C. elegans</i> para determinar la capacidad antimicrobiana	78
V.5 Materiales y métodos para determinar la capacidad antimicrobiana <i>in vitro</i>	82
V.5.1 Preparación de solución de quitosano de crustáceo y de insecto	82

V.5.2	Evaluación de la capacidad antimicrobiana <i>in vitro</i> de una solución de quitosano de crustáceo y de insecto frente a <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Typhimurium</i>	83
V.5.3	Evaluación del efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de quitosano combinado con tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) frente a <i>S. Typhimurium</i>	84
V.5.4	Evaluación del daño celular	84
V.6	Análisis estadístico	86
VI.	RESULTADOS	95
VI.1	Capítulo 1: Efecto de extractos de coliflor, espirulina y soluciones de quitosano sobre <i>C. elegans</i>	95
VI.1.1	Introducción	95
VI.1.2	Resultados y discusión	97
VI.1.2.1	Efecto de extracto de coliflor al 3% (p/v) en la supervivencia, esperanza de vida, y pauta de puesta de huevos de <i>C. elegans</i>	97
VI.1.2.2	Efecto de soluciones de quitosano de crustáceo e insecto al 0,15 % (p/v) en la supervivencia, esperanza de vida y pauta de puesta de huevos de <i>C. elegans</i>	105
VI.1.2.3	Efecto de soluciones de espirulina al 0,1 % (p/v) en la esperanza de vida, supervivencia y puesta de huevos de <i>C. elegans</i>	116
VI.1.3	Conclusiones	124
VI.2	Capítulo 2: Efecto antimicrobiano de quitosano frente a <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Typhimurium in vitro</i>	127
VI.2.1	Introducción	127
VI.2.2	Resultados y discusión	129
VI.2.3	Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano frente a <i>E. coli</i>	129
VI.2.3.1	Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano frente a <i>L. monocytogenes</i>	131

VI.2.3.2	Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano frente a <i>S. Typhimurium</i>	134
VI.2.3.3	Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano en <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Typhimurium</i> tras 8 horas de incubación	136
VI.2.4	Conclusiones	142
VI.3	Capítulo 3: Efecto antimicrobiano de quitosano <i>in vitro</i> combinado con tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) frente a <i>S. Typhimurium</i>	145
VI.3.1	Introducción	145
VI.3.2	Resultados y discusión	147
VI.3.2.1	Efecto del quitosano de crustáceo y de insecto frente a <i>S. Typhimurium</i>	147
VI.3.2.2	Efecto de alta presión hidrostática (HHP) sobre <i>S. Typhimurium</i>	147
VI.3.2.3	Efecto combinado del quitosano y alta presión hidrostática (HHP) sobre <i>S. Typhimurium</i>	150
VI.3.2.4	Evaluación de la población celular dañada expuesta a quitosano y/o tratamientos de alta presión hidrostática (HHP)	154
VI.3.3	Conclusiones	158
VI.4	Capítulo 4: Efecto antimicrobiano de espirulina frente a <i>S. Typhimurium in vivo</i>	163
VI.4.1	Introducción	163
VI.4.2	Resultados y discusión	165
VI.4.2.1	Efecto del extracto de espirulina sobre la supervivencia y esperanza de vida de <i>C. elegans</i> infectados	165
VI.4.2.2	Efecto del extracto de espirulina en <i>S. Typhimurium</i> en el tracto digestivo de <i>C. elegans</i>	172
VI.4.3	Conclusiones	174

VI.5 Capítulo 5: Efecto antimicrobiano de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (coliflor) frente a <i>S. Typhimurium</i> in vivo	177
VI.5.1 Introducción	177
VI.5.2 Resultados y discusión	179
VI.5.2.1 Efecto del extracto de coliflor sobre la supervivencia y esperanza de vida de <i>C.elegans</i> infectados	179
VI.5.2.2 Efecto del extracto de coliflor en <i>S. Typhimurim</i> en el tracto digestivo de <i>C. elegans</i>	186
VI.5.3 Conclusiones	188
VII. DISCUSIÓN	195
VIII. CONCLUSIONES	205
IX. BIBLIOGRAFÍA	213
X. ANEXOS	249

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1. Pared celular bacteriana: Gram negativa (imagen a la izquierda) y Gram positiva (imagen a la derecha) (Chaudhuri y Chaudhuri, 2018)	26
Figura II.2. Estructura de quitina (imagen superior) y quitosano (imagen inferior)	29
Figura II.3. Tricomas de <i>Arthrospira platensis</i> (Borowitzka, 2018; Karali, F., 2011)	37
Figura II.4. Anatomía de <i>C. elegans</i> adulto hermafrodita obtenida por microscopía de contraste de interferencia diferencial (Altun y Hall, 2009). Imágenes modificadas	46
Figura II.5. Sexos de <i>C. elegans</i> : hermafrodita (XX) y macho (XO)	47
Figura II.6. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> a 20 °C (modificado de Altun y Hall, 2009; Byerly et al., 1976)	48
Figura V.1. Procedimiento de obtención de lisis de <i>C. elegans</i>	81
Figura VI.1.1. Curvas de supervivencia de <i>C. elegans</i> para las dos poblaciones consideradas en el estudio con extracto de coliflor	98
Figura VI.1.2. Funciones estimadas de supervivencia de las poblaciones del estudio con extracto de coliflor	99
Figura VI.1.3. Funciones estimadas de riesgo acumulado de las distintas poblaciones del estudio con extracto de coliflor	102

Figura VI.1.4. Promedio de puesta de huevos de <i>C. elegans</i> alimentados sin y con extracto de coliflor	104
Figura VI.1.5. Curvas de supervivencia de <i>C. elegans</i> alimentados en los distintos medios empleados en el estudio con quitosano	106
Figura VI.1.6. Funciones estimadas de supervivencia para las distintas poblaciones del estudio con quitosano	108
Figura VI.1.7. Funciones estimadas de riesgo acumulado de las poblaciones del estudio con quitosano	111
Figura VI.1.8. Promedio de la puesta de huevos de <i>C. elegans</i> en diferentes sustratos del estudio con quitosano	112
Figura VI.1.9. Curvas de supervivencia de <i>C. elegans</i> alimentados en los distintos medios empleados en el estudio con extracto de espirulina	117
Figura VI.1.10. Funciones estimadas de supervivencia de los grupos del estudio con extracto de espirulina	118
Figura VI.1.11. Funciones estimadas de riesgo acumulado de los grupos del estudio con extracto de espirulina	121
Figura VI.1.12. Número promedio de huevos por gusano a lo largo de su vida en el estudio con espirulina	122
Figuras VI.2.1. Evolución de <i>E. coli</i> en diferentes sustratos con una contaminación inicial de 10^3 UFC/mL (A) y 10^6 UFC/mL (B)	130
Figuras VI.2.2. Evolución de <i>L. monocytogenes</i> en diferentes sustratos con una contaminación inicial de 10^3 UFC/mL (A) y 10^6 UFC/mL (B)	133

Figuras VI.2.3. Evolución de <i>S. Typhimurium</i> en diferentes sustratos con una contaminación inicial de 10^3 UFC/mL (A) y 10^6 UFC/mL (B)	135
Figuras VI.3.1. Curvas de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> en medio control (A) y control ácido (B) sin tratar por HHP, tratadas a 300 MPa (2 minutos), y a 450 MPa (2 minutos), durante 49 horas de incubación a 37 °C	149
Figuras VI.3.2. Curvas de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> en medio con quitosano de crustáceo (A) y medio con quitosano de insecto (B) sin tratar por HHP, tratadas a 300 MPa y a 450 MPa durante 49 horas de incubación a 37 °C	151
Figuras VI.3.3. Concentración de células dañadas de <i>S. Typhimurium</i> expuestas a 0,15% de quitosano de crustáceo (A) y quitosano de insecto (B) sin tratamiento de altas presiones	155
Figura VI.3.4. Análisis de células dañadas de <i>S. Typhimurium</i> tratadas a 300 MPa - 2 minutos durante 49 horas de incubación a 37 °C	156
Figura VI.3.5. Análisis de la población de <i>S. Typhimurium</i> tratada a 450 MPa - 2 minutos durante 49 horas de incubación a 37 °C	157
Figura VI.4.1. Curvas de supervivencia para <i>C. elegans</i> con diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de espirulina.....	165
Figura VI.4.2. Funciones estimadas de supervivencia de los grupos del estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de espirulina	167

Figura VI.4.3. Funciones estimadas de riesgo acumulado de los grupos del estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de espirulina	170
Figura VI.4.4. Evolución de la carga microbiana en el intestino del nematodo alimentado (barra gris) y no alimentado (barra blanca) con espirulina a las 48 horas post-infección	173
Figura VI.5.1. Curvas de supervivencia de <i>C. elegans</i> con diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de coliflor.....	180
Figura VI.5.2. Funciones estimada de supervivencia de los grupos del estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de coliflor	182
Figura VI.5.3. Funciones estimadas de riesgo acumulado de los grupos del estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de coliflor	185
Figura VI.5.4. Evolución de la carga microbiana de <i>Salmonella</i> en el intestino de <i>C. elegans</i> a las 24, 48 y 96 horas post-infección alimentados con extracto de coliflor (barras rayadas) y sin extracto de coliflor (barras blancas)	187

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II.1. Fuentes de quitina y quitosano (Zargar et al., 2015)	29
Tabla V.1. Grupos de estudio empleados en la evaluación del efecto de sustancias naturales sobre <i>C. elegans</i> en función del tipo de medio con el que fueron alimentados	77
Tabla V.2. Grupos de estudio empleados en la evaluación de la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales a partir de los cambios en la supervivencia de <i>C. elegans</i>	77
Tabla V.3. Grupos de estudio empleados en la evaluación de la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales a partir de la lisis de <i>C. elegans</i>	78
Tabla VI.1.1. Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio con extracto de coliflor	100
Tabla VI.1.2. . Prueba t-student realizada para los percentiles estimados para la distribución de supervivencia de <i>C. elegans</i> de los grupos considerados en el estudio con extracto de coliflor	101
Tabla VI.1.3. Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio con quitosano	109
Tabla VI.1.4. ANOVA y test post-hoc HSD de Tukey para los valores de percentiles 75, 50 y 25 para la distribución de supervivencia de <i>C. elegans</i> en distintos medios de alimentación del estudio con quitosano	110
Tabla VI.1.5. Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio con espirulina	119

Tabla VI.1.6. Prueba t-student para los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia de <i>C. elegans</i> en los diferentes medios de alimentación del estudio con espirulina	120
Tabla VI.2.1. Comportamiento de <i>E. coli</i> después de 8 horas de incubación en diferentes sustratos	137
Tabla VI.2.2. Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> después de 8 horas de incubación en diferentes sustratos	138
Tabla VI.2.3. Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> después de 8 horas de incubación en diferentes sustratos	139
Tabla VI.3.1. Inactivación de <i>S. Typhimurium</i> como consecuencia del tratamiento por HHP, expresado como $\log_{10} (N_i/N_0) \pm$ desviación estándar en las diferentes matrices estudiadas	148
Tabla VI.4.1. Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de espirulina	168
Tabla VI.4.2. ANOVA y test post-hoc HSD de Tukey para los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia de <i>C. elegans</i> en los diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de espirulina	169
Tabla VI.5.1. Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de coliflor	183
Tabla VI.5.2. ANOVA y test post- hoc HSD de Tukey para los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia de <i>C.elegans</i> en los diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de coliflor	184

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

µg/mL: microgramo/mililitro

µg: microgramo

µm: micrómetro

µM: micromolar

AC: control ácido

ADEC: *E. coli* de adherencia difusa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición

ANOVA: análisis de la varianza

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

a_w: actividad de agua

C: controles sin ácido acético

CaCl₂: cloruro cálcico

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)

cm: centímetro

CMB: concentración mínima bactericida

CMI: concentración mínima inhibitoria

CO₂: dióxido de carbono

DO: densidad óptica

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

EC: *C. elegans* en medio NGM alimentados con *E. coli* OP50

EC-AC: Nematodos alimentados con *E. coli* OP50 en placas de NGM con ácido acético

EC-AC-QC: Nematodos alimentados con *E. coli* OP50 en placas de NGM con solución de quitosano de crustáceo al 0,15 % (p/v) disuelto en ácido acético

EC-AC-QI: Nematodos alimentados con *E. coli* OP50 en placas de NGM con solución de quitosano de insecto al 0,15 % (p/v) disuelto en ácido acético

EC-CL: *C. elegans* en medio NGM con infusión de coliflor al 3 % (p/v) alimentados con *E. coli* OP50

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades)

EC-SP: *C. elegans* en medio NGM con extracto de espirulina al 0,1% (p/v) y alimentados con *E. coli* OP50

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

EHEC o VTEC o STEC: *E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica o productor de toxina Shiga

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

EMB: Eosina azul de metileno

EPEC: *E. coli* enteropatogénica

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

FDA: U.S. Food and Drug Administration (Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos)

g: gramo

GFP: proteína verde fluorescente

GRAS: Generalmente Reconocido como Seguro

h: hora

HHP: altas presiones hidrostáticas

HMWC: Quitosano de alto peso molecular

HSD de Tukey: test de la Diferencia Significativa Honesta de Tukey

kDa: kilodalton

LB: Luria Bertani

LBA: agar de Luria Bertani

LMWC: Quitosano de bajo peso molecular

log (N/N₀): cociente de la concentración de microorganismo a un tiempo determinado (N) entre el valor de la concentración inicial (t = 0 h) (N₀)

LPS: lipopolisacárido

L-ST: *C. elegans* infectados con *Salmonella* Typhimurium durante 24 horas en medio NGM y traspasados a medio NGM con *E. coli* OP50

L-ST-CL: *C. elegans* infectados con *Salmonella* Typhimurium durante 24 horas en medio NGM y traspasados a medio NGM con infusión de coliflor al 3 % (p/v) y *E. coli* OP50

L-ST-SP: *C. elegans* infectados con *Salmonella* Typhimurium durante 24 horas en medio NGM y traspasados a medio NGM con extracto de espirulina y *E. coli* OP50

M: molar

mg/mL: miligramo/mililitro

MgSO₄: sulfato de magnesio

min: minuto

mL: mililitro

MPa: megapascales

NGM: medio de crecimiento de nematodos

NK: células natural killer

O₂: oxígeno

°C: grados centígrados

OMS: Organización Mundial de la Salud

p/v: partes por volumen

PEF: pulsos eléctricos de alto voltaje

pH: potencial hidrógeno

pKa: logaritmo negativo en base 10 de la constante de disociación ácida (Ka)

ppm: partes por millón

PVDF: fluoruro de polivinilideno

QC: quitosano de crustáceo

QI: quitosano de insecto

REDOX: oxidación-reducción u óxido-reducción

rpm: revoluciones por minuto

S.L.: Sociedad Limitada

SS: Sulfato de sodio

ST: *C. elegans* en medio NGM infectados con *Salmonella* Typhimurium

ST-CL: *C. elegans* en medio NGM con infusión de coliflor al 3 % (p/v) infectados con *Salmonella* Typhimurium

ST-SP: *C. elegans* en medio NGM con extracto de espirulina al 0,1% (p/v) infectados con *Salmonella* Typhimurium

t: tiempo

t₀: tiempo a 0 horas

TPP: Tripolifosfato de sodio

TSA: agar triptona- soja

TSB: caldo de triptona de soja

UE: Unión Europea

UFC/gusano: unidades formadoras de colonia/gusano

UFC/mL: unidades formadoras de colonias/mL

UV: ultravioleta

v/v: volumen/volumen

var.:variedad