



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo A.C.**

**CARVACROL INHIBE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE
BIOPELÍCULAS Y PRODUCCIÓN DE EXOENZIMAS DE
*Pectobacterium carotovorum***

Por:

María Melissa Gutiérrez Pacheco

TESIS APROBADA POR LA

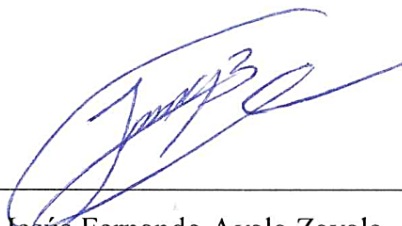
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

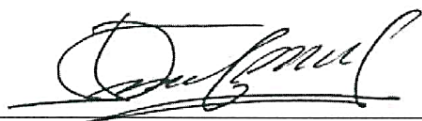
DOCTORADO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

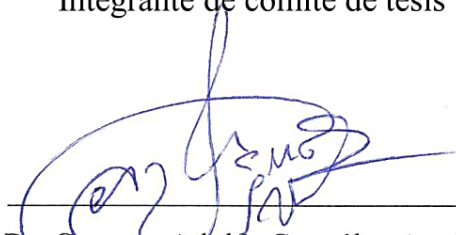
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de María Melissa Gutiérrez Pacheco la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias.



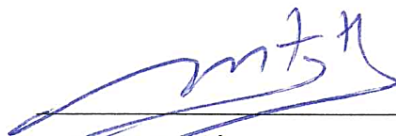
Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Director de Tesis



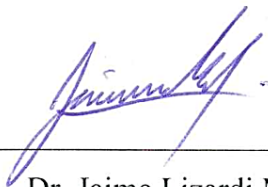
Dr. Tomás Jesús Madera Santana
Integrante de comité de tesis



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Integrante de comité de tesis



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Integrante de comité de tesis



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis “Carvacrol Inhibe el Proceso de Formación de Biopelículas y Producción de Exoenzimas de *Pectobacterium carotovorum*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora María Melissa Gutiérrez Pacheco, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme realizar mis estudios de maestría y ahora de doctorado, logrando así alcanzar una meta importante en mi formación profesional y personal.

Al proyecto CB-2013-01-222691 denominado “Caracterización y evolución de carbohidratos y metabolitos señal en biopelículas de bacterias patógenas expuestas a antimicrobianos de origen vegetal” financiado por el fondo de Ciencia Básica del CONACYT.

A la Coordinación de Vegetales (CTAOV), por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación en esta área y facilitarme equipo e instalaciones. Les agradezco todo el apoyo y consejos durante los seminarios, los cuales nutrieron este trabajo.

A mi director de tesis Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala por todo su apoyo, guía y consejos en la realización de este trabajo. Por sus infinitas enseñanzas que me permitieron crecer como persona y profesionista. Le agradezco por hacer sacar lo mejor de mí siempre y por su amistad.

A mi comité de tesis: Dr. Gustavo González, Dr. Miguel Ángel Martínez, Dr. Tomás Madera y Dr. Jaime Lizardi, gracias por todo su apoyo y consejos.

Al Laboratorio de Tecnologías Emergentes, M. C. Brenda Silva y M. C. Reynaldo Cruz, gracias por su guía, apoyo y amistad durante este largo camino. A mis amigos Thalía, Melvin, Pancho, Kechu, Karen, Patty y Toño, gracias por todo su apoyo y cariño a lo largo de todos estos años. Por volver más llevaderos los días con su compañía y risas.

A mis amigas Anna, Thaly, Stephanie, Chio, Karen y Andrea, por estar ahí en todo momento y compartir tantas experiencias juntas.

A la Dras. Filomena Nazzaro y Florinda Fratianni por sus atenciones y apoyo durante la realización de mi estancia de investigación en el Istituto di Scienze dell' Alimentazione en Avellino, Italia. Gracias por hacer muy amena mi estadía en su laboratorio.

Al Dr. Alonso López Zavala por su ayuda en la realización de parte de mis experimentos en el Laboratorio de Bioquímica de Proteínas, así como a los demás integrantes del laboratorio que me

recibieron y apoyaron en todo momento: M. C. Luis Morado, Dra. María de Jesús Moreno y M. C. Cesar Otero.

A las personas que contribuyeron en la realización de este trabajo con apoyo técnico y consejos: M. C. Mónica Villegas, M. C. Emmanuel Aispuro, Q. B. María del Carmen Granados, Q. B. Blanca Olivia Briceño, Q. A. Thalia Islava, M. C. Alejandra Preciado y a todos los integrantes del Lab. de Antioxidantes y Alimentos Funcionales.

DEDICATORIAS

A Dios

Por estar siempre a mi lado en cada momento y llenarme de bendiciones.

A mis padres Olga y Juan José

Por estar a mi lado en cada momento y enseñarme a ser una persona de bien y a superarme día con día. Siempre les estaré eternamente agradecida por la confianza y el gran amor puro y sincero que me han brindado.

A mi hermano Juanito y Sthefan

Por su amor y apoyo incondicional, porque aunque estemos lejos, estamos juntos en corazón y pensamiento.

A mis sobrinos Luna y Alan

¡Porque son mi felicidad! y a pesar de la distancia los llevo siempre conmigo.

A mi hermana Lisdeth

Por estar a mi lado en todo momento y siempre buscar la manera de animarme con tus ocurrencias. Por tu amor incondicional y por compartir toda una vida conmigo. No pude tener una mejor compañera que tú en esta vida

A mi esposo Luis Alberto

Por ser mi compañero de vida, por tu amor, por ser mi hogar y por nuestra hermosa pequeña familia. Siempre buscaste la manera de hacerme ver lo mejor de las cosas y a sacar lo mejor de mí. Gracias por el apoyo y amor incondicional que siempre me has brindado, te amo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIAS	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1.INTRODUCCIÓN	14
2.ANTECEDENTES	17
2.1. Enfermedades y Contaminación Causada por Bacterias Patógenas de Plantas.....	17
2.2. Factores de Virulencia de <i>Pectobacterium carotovorum</i>	20
2.3. Regulación de la Formación de Biopelículas y Producción de Exoenzimas de <i>P. carotovorum</i> Mediante el Quorum Sensing	24
2.4. Extractos de Plantas y Sus Principales Compuestos Atenúan la Virulencia de Bacterias Fitopatógenas.....	30
2.5. Carvacrol como Inhibidor de la Comunicación Intercelular, Formación de Biopelículas y Síntesis de Exoenzimas	32
3.HIPÓTESIS	35
4.OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo General.....	36
4.2. Objetivos Específicos	36
5.MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1. Etapa 1: Evaluación del Efecto del Carvacrol Sobre el Proceso de Formación de Biopelículas de <i>P. carotovorum</i>	37
5.1.1. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Bactericidas (CMB) y de Formación (CMIB) y Erradicación (CMEB) de Biopelículas de <i>Pectobacterium carotovorum</i> Expuestas a Carvacrol	37
5.1.2. Efecto del Carvacrol Sobre la Motilidad de <i>P. carotovorum</i>	38
5.1.3. Carga Superficial Bacteriana de <i>P. carotovorum</i> Expuesta a Carvacrol.	38
5.1.4. Energía Libre de Adhesión de <i>P. carotovorum</i> Expuesta a Carvacrol.	39
5.1.5. Efecto del Carvacrol Sobre la Formación de Biopelículas y Secreción de SPE de <i>P. carotovorum</i>	41
5.1.6. Análisis Estadístico.....	42
5.2. Etapa 2: Efecto del Carvacrol Sobre la Producción de Exoenzimas de <i>P. carotovorum</i>	42

CONTENIDO (Continuación)

5.2.1. Inhibición de la Actividad de Exoenzimas de <i>P. carotovorum</i> Expuesta a.....	
Carvacrol	42
5.2.2. Análisis de Modelaje Molecular Entre el Carvacrol y las Exoenzimas de <i>P. carotovorum</i>	43
5.2.3. Efecto del Carvacrol Sobre la Patogenicidad <i>In Vivo</i> de <i>P. carotovorum</i> en Tejidos de Papa.	44
5.2.4. Análisis Estadístico.....	44
5.3. Etapa 3: Efecto del Carvacrol Sobre el QS de <i>P. carotovorum</i>	45
5.3.1. Producción de AHLs por <i>P. carotovorum</i> Expuesta a Carvacrol.....	45
5.3.2. Análisis de Modelaje Molecular Entre Carvacrol y ExpI de <i>P. carotovorum</i>	46
5.3.3. Análisis Estadístico.....	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
6.1. Etapa 1: Evaluación del Efecto del Carvacrol Sobre el Proceso de Formación de Biopelículas de <i>P. carotovorum</i>	47
6.1.1. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Bactericidas (CMB) y de Formación (CMIB) y Erradicación de Biopelículas de <i>P. carotovorum</i> Expuestas a Carvacrol.	47
6.1.2. Efecto del Carvacrol Sobre la Motilidad de <i>P. carotovorum</i>	48
6.1.3. Carga Superficial Bacteriana de <i>P. carotovorum</i> Expuesto a Carvacrol.....	50
6.1.4. Energía Superficial y Potencial de Adhesión de <i>P. carotovorum</i> Expuesta a Carvacrol.	51
6.1.5. Efecto del Carvacrol Sobre la Formación de Biopelículas y Secreción de SPE de <i>P. carotovorum</i>	54
6.2. Etapa 2: Efecto del Carvacrol Sobre la Producción de Exoenzimas de <i>P. carotovorum</i>	60
6.2.1. Inhibición de la Actividad de Exoenzimas de <i>P. carotovorum</i> Expuesta a Carvacrol	60
6.2.2. Efecto del Carvacrol Sobre la Maceración de Tejidos de Papa causada por <i>P. carotovorum</i>	62
6.3. Etapa 3: Efecto del Carvacrol Sobre el QS de <i>P. carotovorum</i>	67
6.3.1. Producción de AHLs por <i>P. carotovorum</i> Expuesta a Carvacrol	67
6.3.2. Modelaje Molecular Entre Carvacrol y ExpI de <i>P. carotovorum</i>	70
7. CONCLUSIÓN.....	74
8. BIBLIOGRAFÍA.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página	
1.	El proceso de formación de biopelículas consiste en 5 etapas: 1) adhesión reversible, 2) adhesión irreversible, 3) formación de microcolonias, 4) maduración de la biopelícula y 5) dispersión de las células embebidas en la biopelícula para colonizar otras superficies.....	22
2.	Estructuras abreviadas de stewartan, amilovorán, celulosa y levan, principales carbohidratos presentes en biopelículas de patógenos de plantas.....	23
3.	ExpI sintetiza AHL a partir de los sustratos SAM y acil-ACP mediante un proceso de acilación y lactonización.....	25
4.	ExpR1 y ExpR2 regulan negativamente la síntesis de exoenzimas en <i>P. carotovorum</i> a través de la activación de RsmA.....	28
5.	El QS regula la síntesis de polisacáridos en <i>P. stewartii</i> a través de la activación de la expresión de genes <i>cps</i>	29
6.	Cavidad hidrofóbica de ExpI donde se lleva a cabo el reconocimiento de la cadena de acilo transportada por ACP y el proceso de N-acilación mediante el ataque nucleofílico entre el grupo amino desprotonado de SAM y el 1-carbono carbonilo de la cadena de acilo.....	34
7.	Curvas de crecimiento de <i>P. carotovorum</i> expuesta a concentraciones sub-inhedoras de carvacrol.....	49
8.	Energía superficial de <i>P. carotovorum</i> no expuesta (A) y expuesta a carvacrol (B).....	52
9.	Efecto del carvacrol en la formación de biopelículas de <i>P. carotovorum</i> en cupones de polipropileno incubados a 28 °C por 48 h.....	55
10.	Imágenes de microscopía de biopelículas de <i>P. carotovorum</i> no tratadas y tratadas con carvacrol, incubadas a 28 °C por 24 h.....	56
11.	Efecto del carvacrol en la síntesis de SPE durante la formación de biopelículas de <i>P. carotovorum</i> en cupones de polipropileno a 28 °C por 48 h.....	57
12.	Actividad poligalacturonasa (A) y pectato liasa (B) en sobrenadantes de cultivos de <i>P. carotovorum</i> no expuestos (control) y expuestos a 0.66 mM de carvacrol durante 24 h a 28 °C.....	61
13.	Análisis de modelaje molecular del carvacrol con las proteínas poligalacturonasa (A) y pectato liasa (B) de <i>P. carotovorum</i>	63
14.	Efecto del carvacrol sobre el daño a tejido de papa causado por <i>P. carotovorum</i> durante 48 h a 28 °C.....	64

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
15.	Efecto del carvacrol sobre el daño a tejido de papa causado por <i>P. carotovorum</i> durante 96 h a 28 °C (A). El tratamiento no afectó la carga bacteriana durante el ensayo (B).....	65
16.	Producción de 3-oxo-C6-AHL de <i>P. carotovorum</i> expuesta a carvacrol (0.66 mM) durante 24 h de incubación a 28 °C.....	68
17.	Homología del modelo estructural de ExpI de <i>P. carotovorum</i> con la estructura cristalográfica de EsaI (PDB 1KZF) de <i>P. stewartii</i>	70
18.	Modelaje molecular de SAM (A) y carvacrol (B) en el sitio de unión a acil-ACP de ExpI.....	72

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Producción mundial y pérdidas de los principales cultivos básicos.....	18
2	Virulencia de bacterias fitopatógenas: sistemas QS, moléculas señal y factores de virulencia.....	27
3.	Motilidad tipo swimming de <i>P. carotovorum</i> expuesta a carvacrol durante 24 h de incubación a 28 °C.....	49
4.	Carga superficial de <i>P. carotovorum</i> expuesta a carvacrol durante 24 h de incubación a 28 °C.....	51
5.	Potencial de adhesión (ΔG_{adh}) entre <i>P. carotovorum</i> expuesta a carvacrol y la superficie de polipropileno.....	53
6.	Energía de afinidad e interacciones principales obtenidas del modelaje molecular entre SAM, carvacrol y Expl.....	73

RESUMEN

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* es una bacteria causante de la pudrición blanda en tejidos vegetales debido a su capacidad para formar biopelículas y exoenzimas. La virulencia de *P. carotovorum* está regulada por *quorum sensing* (QS), a través de la síntesis y reconocimiento de acil homoserina lactonas (AHLs), por medio de las proteínas ExpI/ExpR. Por lo que una estrategia para su control sería interrumpir el QS aplicando carvacrol, un terpenoide antibacteriano del aceite esencial de orégano que ha afectado el QS en otras bacterias. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del carvacrol sobre la síntesis de AHL para inhibir la formación de biopelículas y síntesis de exoenzimas de *P. carotovorum*. Las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas del carvacrol fueron de 2.66 y 3.99 mM, respectivamente; mientras que concentraciones de 1.33 y 3.99 mM fueron necesarias para inhibir y erradicar biopelículas, respectivamente. Se eligió la concentración de 0.66 mM de carvacrol para evaluar su efecto sobre las variables de respuesta de interés, sin afectar la viabilidad celular y poder tener un acercamiento sobre su posible mecanismo de acción. A esta concentración, se redujo la carga superficial bacteriana (-2.15 mV), potencial de adhesión (-1.5 mJ/m²), motilidad (48.2 mm) y síntesis de polisacáridos (13.83 EG/cm²) de *P. carotovorum* comparado con el control. Adicionalmente, el carvacrol afectó la síntesis de exoenzimas, mostrando una reducción en la actividad poligalacturonasa (38.76%) y pectato liasa (50.19%) e incidencia de la enfermedad causada por esta bacteria en un 70-90% en tejidos de papa con respecto al control. La disminución de los factores de virulencia mencionados anteriormente se relacionó con una posible interacción entre carvacrol y la proteína ExpI, causando una reducción (8.93%) en la síntesis 3-oxo-C6-AHL, molécula implicada en la regulación de estos procesos. Esto se evidenció en el análisis de modelaje molecular el cual mostró interacciones hidrofóbicas en el sitio de unión a la cadena de acilos (-4.7 kcal/mol) de ExpI. En conclusión, el carvacrol afectó el proceso de formación de biopelículas y síntesis de exoenzimas de *P. carotovorum* y dicho efecto se relacionó con una reducción de AHLs.

Palabras clave: terpenoide, comunicación intercelular, agregados bacterianos, enzimas extracelulares, anti-virulencia.

ABSTRACT

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* is a bacterium that causes soft in plant tissues due to its capacity to form biofilms and exoenzymes. *P. carotovorum* virulence is regulated by *quorum sensing* (QS), through the synthesis and recognition of acyl homoserine lactones (AHLs) by means of the ExpI/ExpR proteins. So, a strategy for its control would be to interrupt the QS applying carvacrol, an antibacterial terpenoid of oregano essential oil, that has affected the QS in other bacteria. For this reason, the objective of this work was to determine the effect of carvacrol on AHL synthesis to inhibit biofilm formation and exoenzymes synthesis of *P. carotovorum*. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of carvacrol were 2.66 and 3.99 mM, respectively; while concentrations of 1.33 and 3.99 mM were necessary to inhibit and eradicate biofilms, respectively. The concentration of 0.66 mM of carvacrol was chosen to evaluate its effect on the response variables of interest, without affecting cell viability and having an approach on its possible mechanism of action. At this concentration, the bacterial surface charge (-2.15 mV), adhesion potential (-1.5 mJ/m²), motility (48.2 mm) and polysaccharide synthesis (13.83 GE/cm²) of *P. carotovorum* were reduced, compared to the control. Additionally, carvacrol affected the synthesis of exoenzymes, showing a reduction in polygalacturonase (38.76%) and pectate lyase (50.19%) activities and the incidence of the disease caused by this bacterium in 70-90% in potato tissues with respect to the control. The reduction of the afore mentioned virulence factors was related with a possible interaction between carvacrol and ExpI protein, causing a reduction (8.93%) in the synthesis of 3-oxo-C₆-AHL, molecule implicated in the regulation of these processes. This was evidenced in the molecular docking analysis which showed hydrophobic interactions at the acyl chain binding site (-4.7 kcal/mol) of ExpI. In conclusion, carvacrol affected the biofilm formation process and exoenzymes synthesis of *P. carotovorum* and this effect was related to a reduction of AHLs.

Keywords: terpenoid, intercellular communication, bacterial aggregates, extracellular enzymes, anti-virulence.

1. INTRODUCCIÓN

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* es una bacteria Gram-negativa de gran importancia económica debido a que causa la enfermedad “pudrición blanda o bacteriana” en diversos cultivos como la papa, repollo, cebolla, rábano, coles de bruselas y pepino, entre otros, durante su cultivo, transporte y almacenamiento, resultando en altas pérdidas cada año y un considerable daño económico (Toth *et al.* 2003). La capacidad de *P. carotovorum* para adherirse y formar biopelículas es un factor importante que contribuye a su capacidad para infectar los tejidos de las plantas, así como a su resistencia y persistencia en diferentes ambientes, especialmente en el campo. Sin embargo, esta bacteria también puede estar presente en las superficies durante el manejo posterior a la cosecha, ya que causa contaminación cruzada y descomposición posterior a la cosecha (Czajkowski *et al.* 2011).

Las biopelículas son un consorcio de microorganismos embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de síntesis propia compuesta por carbohidratos, proteínas, lípidos y material genético, cuya composición varía entre microorganismos, siendo para *P. carotovorum* aún desconocida. El proceso de formación de biopelículas se ha generalizado que consiste en 5 etapas principales: 1) adhesión reversible, 2) adhesión irreversible, 3) microcolonias 4) maduración y 5) dispersión (Stoodley *et al.* 2002). Aunado a su capacidad para formar biopelículas, esta bacteria sintetiza otros factores de virulencia como lo son las exoenzimas pectato liasas, poligalacturonasas y pectin metil esterasas que degradan principalmente los componentes pécticos de la pared celular liberando nutrientes para su crecimiento (Pérombelon 2002). En general, la patogenicidad de *P. carotovorum* es atribuida a su capacidad de expresar diversos factores de virulencia como la motilidad, SPE, biopelículas y exoenzimas, los cuales en conjunto favorecen el desarrollo de la enfermedad.

La expresión de los factores de virulencia se produce a través del proceso de comunicación intercelular “*quorum sensing*” (QS) (Mole *et al.* 2007). El QS permite que las bacterias controlen su densidad poblacional a través de la secreción y detección de moléculas señal llamadas acil homoserina lactonas (AHL). En *P. carotovorum*, las AHL son sintetizadas por la proteína acil homoserina lactona sintasa (ExpI) a partir de S-adenosil metionina y una cadena de acilo transportada por la proteína acarreadora de acilo (ACP por sus siglas en inglés) mediante un

proceso de acilación y lactonización (Watson *et al.* 2002). En la mayoría de las bacterias Gram-negativas, cuando la concentración de AHL alcanza un nivel umbral, estas interactúan con proteínas receptoras (tipo LuxR) y forman un complejo activo con afinidad a regiones promotoras de genes que activan la expresión de factores de virulencia (von Bodman *et al.* 2003).

Se ha reportado que la presencia de AHL determina la activación de la síntesis de factores de virulencia; tal es el caso de Lee *et al.* (2013) quienes reportaron que cepas mutantes del gen *expI* que codifica para la proteína ExpI encargada de la síntesis de AHL, no produjeron exoenzimas y se redujo la formación de biopelículas en un 77%. De manera similar, en *P. atrosepticum* la supresión del gen *expI* provocó una disminución de la abundancia de transcritos de las exoenzimas (*pnl*, *pel*, *peh*, *pme*, *cel* y *prt*). Por otra parte, von Bodman *et al.* (2003) encontraron que la supresión de este gen en *P. carotovorum* eliminaba la síntesis de AHL y la producción de SPE, lo cual se reflejó directamente en una reducción de la virulencia. Por lo tanto, se han buscado compuestos que afecten la comunicación intercelular a través de la reducción o inhibición de la síntesis de AHL con la finalidad de afectar la virulencia bacteriana.

Los aceites esenciales y sus principales constituyentes han demostrado potencial para inhibir las células bacterianas en estado planctónico y en biopelículas (Ortega-Ramirez *et al.* 2014, Tapia-Rodriguez *et al.* 2017). El carvacrol, un terpenoide hidrofóbico presente en el aceite esencial de orégano, ha mostrado un alto potencial antibacteriano y se ha propuesto como un inhibidor potencial de la formación de biopelículas y otros factores de virulencia de diversas bacterias, incluida *P. carotovorum* (Joshi *et al.* 2016, Tapia-Rodriguez *et al.* 2019). Burt *et al.* (2014) reportaron que el carvacrol (a concentraciones subinhibitorias, <0.5 mM) inhibió la formación de biopelículas de *Chromobacterium violaceum*, *Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus*. Tapia-Rodriguez *et al.* (2017) observaron que este compuesto (a 3.9 y 0.7 mM) redujo la síntesis de piocianina y la formación de biopelículas, factores de virulencia regulados por el sistema QS en *Pseudomonas aeruginosa*, y dicho efecto fue atribuido a una reducción en la síntesis de AHL.

A pesar de que existen estudios previos sobre el efecto del carvacrol sobre los factores de virulencia en fitopatógenos, es importante resaltar que se desconoce cómo es que se lleva a cabo el proceso de formación de biopelículas y su composición, síntesis de exoenzimas y otros factores de virulencia de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* al ser expuestos a carvacrol y como se relaciona esto con una inhibición de la síntesis de AHL por su posible interacción con la proteína ExpI. Por

lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del carvacrol sobre el proceso de formación de biopelículas, síntesis de exoenzimas y comunicación intercelular de *P. carotovorum*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades y Contaminación Causada por Bacterias Patógenas de Plantas

La contaminación bacteriana de las superficies de tejidos vegetales o en contacto con estos es un grave problema que compromete la seguridad alimentaria, favorece la contaminación cruzada y propaga enfermedades (Stepanović *et al.* 2004, Van Houdt y Michiels 2010). En las plantas, la colonización bacteriana es un fenómeno natural que ocurre en una amplia gama de condiciones, como la disponibilidad de nutrientes, humedad y pH cercano al neutro. Las enfermedades de las plantas son responsables de la pérdida de muchos cultivos, causando una reducción en la cantidad y calidad de los productos cosechados. Al menos el 10% de la producción mundial de vegetales se pierde debido a enfermedades bacterianas adquiridas durante los periodos de pre- y post-cosecha. Durante la pre-cosecha, se pueden establecer bacterias patógenas y después éstas pueden crecer y desarrollar la infección durante la post-cosecha (Din *et al.* 2011). Este proceso se ha relacionado con el uso de agua contaminada durante el riego en la pre-cosecha (Hamilton *et al.* 2006), así como el lavado de superficies e instalaciones de almacenamiento y procesamiento pos-cosecha. Ésta contaminación cruzada aumenta a través de las superficies de contacto, como el acero inoxidable, cajas de cartón y polipropileno, incrementando el riesgo de infección y la necesidad de desinfectantes. En este sentido, el ciclo de infección de los fitopatógenos puede comenzar no sólo en el campo, sino también durante el manejo posterior a la cosecha cuando las condiciones ambientales son favorables.

Los tejidos vegetales representan más del 80% de la dieta humana y son esenciales para garantizar la seguridad alimentaria (FAO 2015). Por lo tanto, las enfermedades bacterianas de las plantas son un problema que debe ser controlado (Strange y Scott 2005). La mayoría de los seres humanos viven con una dieta basada en cultivos básicos y su producción y conservación están comprometidas por el ataque bacteriano. El Cuadro 1 lista las principales fuentes vegetales para la nutrición humana; pero que al mismo tiempo, son susceptibles a varias enfermedades. Hoy en día, no hay estadísticas recientes sobre las pérdidas de cultivos básicos causadas particularmente por

bacterias, lo cual representa un problema considerando los datos pasados y la prerrogativa internacional para garantizar la seguridad alimentaria.

Cuadro 1. Producción mundial y pérdidas de los principales cultivos básicos.

Cultivo	Producción (ton) ¹	Pérdidas (%) ²
Maíz	1,060,107,470	8.5
Arroz	740,961,445	10.8
Trigo	749,460,077	10.2
Papa	376,826,967	14.5
Soya	334,894,085	8.9
Vegetales	290,130,864	-
Sorgo	63,930,558	-
Raíces y tubérculos	10,455,162	-

¹Producción mundial de cultivos básicos al 2016 (FAOSTAT 2016).

²Pérdidas de cultivos (%) atribuidas a enfermedades de plantas alrededor del mundo entre 2001-2003 (Oerke 2006).

- Estadísticas no reportadas.

Se ha reportado que las enfermedades bacterianas causan pérdidas del 20 al 40% de la producción mundial de alimentos (FAO 2015), y se han relacionado con la presencia de fitopatógenos como *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas oryzae*, *Pectobacterium amylovorum*, *Xylella fastidiosa*, *Dickeya dadantii* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Mansfield *et al.* 2012). Estas bacterias causan diferentes tipos de enfermedades en una gran variedad de productos vegetales; por ejemplo, *P. syringae* coloniza las hojas de frijol y promueve la aparición de la enfermedad de “la mancha marrón” causando la agregación celular (Danhorn y Fuqua 2007). *A. tumefaciens* causa el “tumor del cuello”, una de las enfermedades de las plantas más graves del mundo. En la naturaleza, esta bacteria induce crecimiento neoplásico en la planta infectada, reduciendo el vigor y el rendimiento del cultivo (Mansfield *et al.* 2012).

Por otro lado, *R. solanacearum* causa la enfermedad de “marchitamiento vascular” en papa, tomate, tabaco y bananas; caracterizada por la síntesis de exopolisacáridos que reducen el flujo de agua en los vasos del xilema, así como por la colonización de los frutos, que aparecen como síntomas durante su almacenamiento pos-cosecha (Kumar *et al.* 2016). En general, los síntomas causados por estos patógenos están asociados con la interferencia con las funciones vitales de la planta, incluida la regulación hormonal, la reproducción, la captación de agua y su transporte, así como la calidad de sus frutos (Vidaver 2001). Dentro de los patógenos que más causan daño a los cultivos se encuentra *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, un bacilo Gram-negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, de gran importancia económica debido a que causa la enfermedad de “pudrición blanda o bacteriana” en diversos cultivos como repollo, papa, cebolla, rábano, entre otros productos (Toth *et al.* 2003).

Se ha reportado que éste microorganismo puede establecerse y multiplicarse durante el cultivo, transporte y almacenamiento tanto en superficies bióticas o abióticas (Lee *et al.* 2013). *P. carotovorum* puede encontrarse en la superficie de las plantas, en los frutos, suelo y puede entrar en la planta a través de heridas o aberturas naturales de la superficie (Toth *et al.* 2003). Una vez dentro de la planta, permanece en el tejido vascular o espacios intercelulares de los tejidos parenquimatosos donde permanece hasta que las condiciones ambientales, incluyendo el agua libre, disponibilidad de oxígeno y temperatura se vuelven adecuadas para el desarrollo de la enfermedad (Toth *et al.* 2003).

La enfermedad de pudrición blanda causada por *P. carotovorum* ha sido más estudiada en tubérculos y se favorece en condiciones húmedas provocando la maceración de la pared celular a una consistencia cremosa que se vuelve oscura en presencia de aire, desarrollando un olor desagradable cuando es invadido por microorganismos secundarios (Czajkowski *et al.* 2011). Durante el almacenamiento en almacenes con ventilación inadecuada, la pudrición se puede propagar a tubérculos adyacentes a medida que el líquido de tejidos en descomposición se filtra sobre otros, conduciendo a las pérdidas económicas mencionadas anteriormente (Czajkowski *et al.* 2011). La maceración de los tejidos se da por la capacidad de esta bacteria para sintetizar de manera coordinada altos niveles de múltiples exoenzimas, incluyendo pectinasas, celulasas y proteasas que degradan a diferentes niveles la pared celular liberando nutrientes para el crecimiento bacteriano (Pérombelon 2002). En general, la patogenicidad de este microorganismo es atribuida a su capacidad para sintetizar diversos factores de virulencia como la motilidad, sustancias poliméricas

extracelulares (SPE), formación de biopelículas y exoenzimas, las cuales en conjunto favorecen el desarrollo de la enfermedad.

2.2. Factores de Virulencia de *Pectobacterium carotovorum*

Las plantas son ricas en agua y nutrientes y ofrecen un entorno óptimo para la supervivencia y proliferación bacteriana (Speth *et al.* 2007). Para cumplir con este reto los patógenos expresan varios factores de virulencia que permiten su ciclo de infección. Un factor de virulencia es una respuesta molecular del patógeno que influye específicamente en las funciones vitales del huésped para permitir el crecimiento del patógeno y la colonización. *P. carotovorum* sintetiza un arsenal de exoenzimas como principal factor de virulencia (Liu *et al.* 2008). Estas son proteínas extracelulares que atacan la pared celular de hojas, frutos y vegetales, degradando principalmente los componentes pécticos para exitosamente establecer una infección (Pérombelon 2002).

Las exoenzimas que produce *P. carotovorum* incluyen pectato liasa, pectin liasa, pectin metil esterasa, celulasa, poligalacturonasa y proteasas. Estas son secretadas a través de los sistemas de secreción Tipo I (T1SS) (proteasa) y Tipo II (T2SS) (pectinasas y celulasas) los cuales translocan macromoléculas a través de la membrana hacia el medio extracelular y en algunos casos dentro del hospedero (Pieretti *et al.* 2012). Se ha reportado que el sistema de secreción tipo II es requerido para la secreción de diversos factores de virulencia en patógenos como *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y algunas especies de *Pectobacterium* (Liu *et al.* 2008). Se ha reportado que la síntesis de exoenzimas en *Pectobacterium* se lleva a cabo cuando la densidad poblacional es alta con la finalidad de evadir el sistema de defensa de la planta (von Bodman *et al.* 2003).

Aunado a su capacidad de sintetizar exoenzimas, *P. carotovorum* también forma biopelículas, las cuales son un consorcio de bacterias embebidas en una matriz de SPE de síntesis propia compuesta principalmente de carbohidratos, proteínas, lipopolisacáridos y material genético (Flemming y Wingender 2010). La formación de biopelículas es una característica importante en la colonización de fitopatógenos sobre superficies bióticas y abióticas; esta provee protección contra estrés ambiental y antibióticos. Se ha generalizado que este proceso consiste en 5 etapas principales: 1)

adhesion reversible, 2) adhesion irreversible, 3) formación de microcolonias, 4) maduración y 5) dispersión (Stoodley *et al.* 2002). La etapa inicial es la adhesión de células planctónicas a una superficie (Figura 1); para ello, las bacterias deben viajar ayudadas por la presencia de flagelos, fimbrias tipo I, IV y curli, dependiendo de la especie. Para que se lleve a cabo el proceso de adhesión, la bacteria debe vencer las fuerzas electrostáticas que le impiden adherirse a la superficie (Garrett *et al.* 2008). Dentro de algunas características fisicoquímicas que influyen en este proceso están las características de la superficie como la hidrofobicidad y la carga, así como las características superficiales de la bacteria como la energía, la carga, presencia de apéndices celulares y SPE (Yaron y Römling 2014).

Se ha reportado que la motilidad en *Pectobacterium* spp. es determinante para su virulencia ya que favorece la colonización, formación de biopelículas y progresión de la enfermedad. Existen dos tipos de motilidad flagelar, la “swimming” y “swarming”, y la no flagelar “twitching”. En la swimming, las bacterias se trasladan individualmente a través de un medio líquido homogéneo, sin necesidad de una interfaz para ejercer empuje; mientras que la swarming es el movimiento de varias bacterias en conjunto sobre un sustrato. Por otra parte, la motilidad tipo twitching se da por la extensión, anclaje y retracción del pili polar tipo IV (Mattick 2002, Kearns 2010). Hossain *et al.* (2005) reportaron que mutantes no motiles produjeron exoenzimas al mismo nivel que cepas silvestres; sin embargo, el grado de patogenicidad fue significativamente menor. En general, la motilidad proporciona acceso a sitios de unión e impulsa la adhesión bacteriana inicial ya que ayuda a contrarrestar las fuerzas de repulsión entre las células y la superficie (Stoodley *et al.* 2002). Durante la etapa 2, se lleva a cabo un aumento en el proceso de comunicación intercelular que da pie a la síntesis de SPE que promueve una adhesión más fuerte e irreversible y cuya función es proteger las células bacterianas y otorgar estabilidad al agregado (Czacyk y Myszka 2007). Se ha reportado que la síntesis de SPE es el principal factor que contribuye a la formación de biopelículas y favorece el crecimiento, supervivencia y virulencia bacteriana (von Bodman *et al.* 2003). La composición de SPE de las biopelículas varía entre microorganismos, siendo para los fitopatógenos principalmente compuesta de carbohidratos. Por ejemplo, las biopelículas de *P. stewartii* y *P. amylovorum* están compuestas por stewartan, amilovorán y levan, mientras que *D. dadantii* produce principalmente celulosa (Langlotz *et al.* 2011) (Figura 2). Sin embargo, la composición de las biopelículas de *P. carotovorum* es aún desconocida.

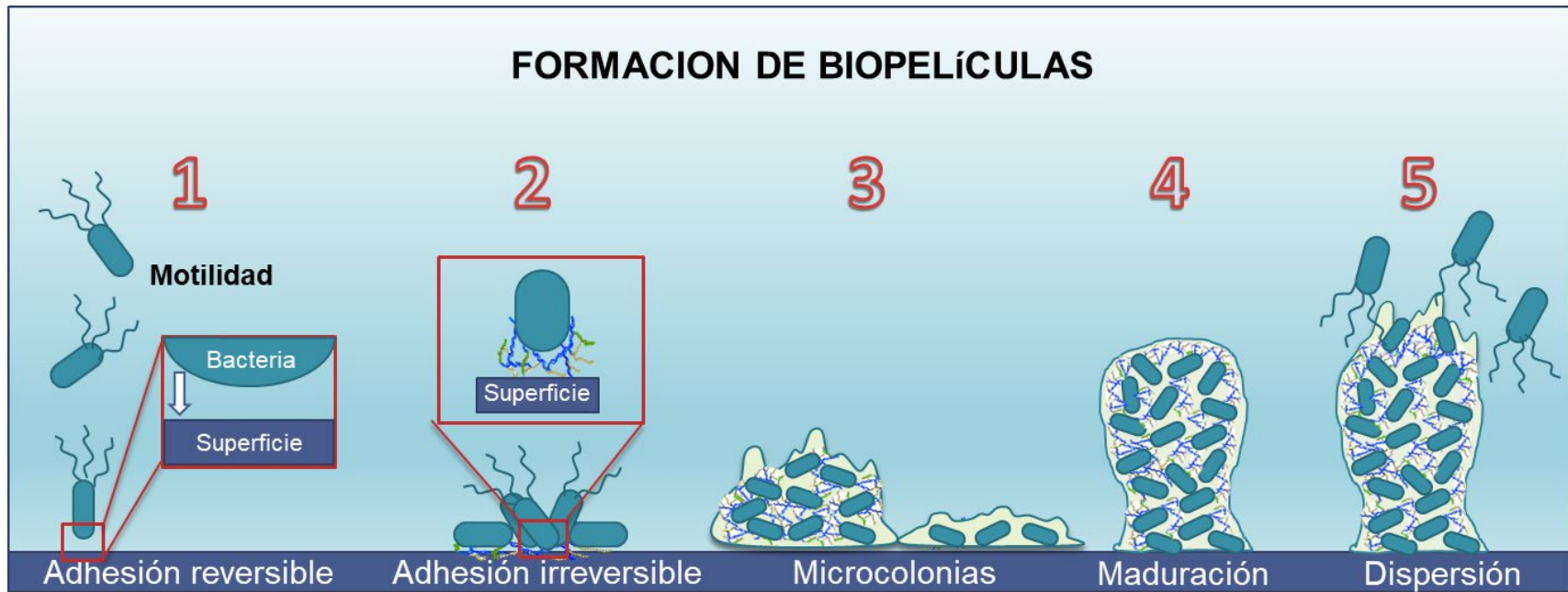


Figura 1. El proceso de formación de biopelículas consiste en 5 etapas: 1) adhesión reversible, 2) adhesión irreversible, 3) formación de microcolonias, 4) maduración de la biopelícula y 5) dispersión de las células embebidas en la biopelícula para colonizar otras superficies.

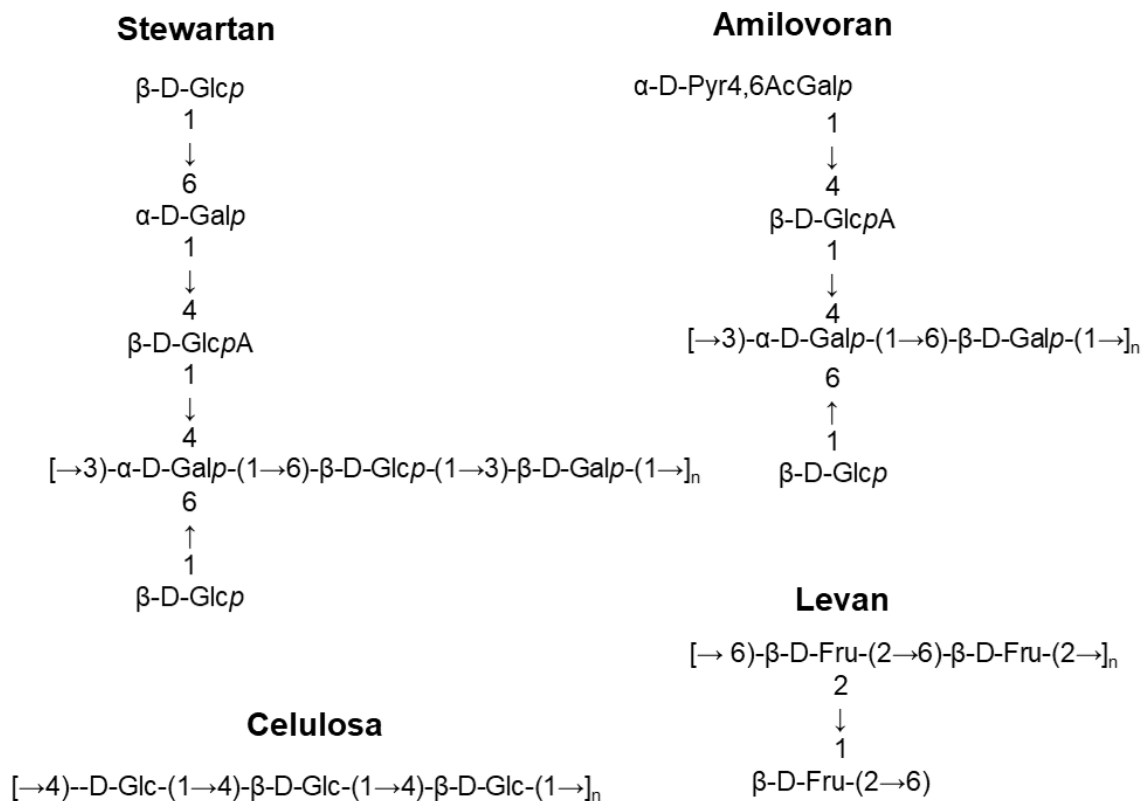


Figura 2. Estructuras abreviadas de stewartan, amilovorán, celulosa y levan, principales carbohidratos presentes en las SPE de biopelículas de fitopatógenos.

Uno de los síntomas de algunas enfermedades causadas por fitopatógenos es el bloqueo de la adquisición y transporte de agua y se ha propuesto que las SPE bacterianas secretadas son responsables de esto. Cuando se establecen las microcolonias bacterianas (etapa 3 del desarrollo de la biopelícula), éstas continúan creciendo creando una estructura tridimensional para contener grupos de células y canales que distribuyen de manera efectiva nutrientes moléculas de señalización (Srey *et al.* 2013). Durante la etapa 4, se coloniza completamente la superficie y en este punto es posible que *Pectobacterium* sintetice enzimas extracelulares para promover la infección (Czaczyk y Myszka 2007). Finalmente, en la etapa 5, las células embebidas en las biopelículas se separan para dispersarse y colonizar otras superficies (Figura 1) (Stoodley *et al.* 2002). La síntesis de factores de virulencia de *P. carotovorum* está regulado por el proceso de comunicación intercelular “*quorum sensing*” (QS).

2.3. Regulación de la Formación de Biopelículas y Producción de Exoenzimas de *P. carotovorum* Mediante el *Quorum Sensing*

La expresión de los factores de virulencia se produce a través de una red reguladora compleja que involucra el sistema QS (Mole *et al.* 2007). El QS permite que las bacterias controlen su densidad poblacional a través de la secreción y detección de pequeñas moléculas señal llamadas acil homoserina lactonas (AHL). La proteína acil homoserina lactona sintasa (ExpI) de *P. carotovorum* es una acil transferasa que cataliza la reacción entre la S-adenosil metionina y una cadena de acilo transportada por la proteína acarreadora de acilo (ACP por sus siglas en inglés). En esta reacción, la cadena de acilo es presentada a la AHL sintasa como un tioéster del grupo prostético fosfopanteteína-ACP, lo que resulta en un ataque nucleofílico en el carbono 1-carbonilo por la amina de la SAM en la reacción de acilación. La lactonización se produce mediante otro ataque nucleofílico en el carbono γ de la SAM por su propio oxígeno carboxílico para producir las AHL 3-oxo-C6-AHL y 3-oxo-C8-AHL, así como los subproductos 5-metil-tioadenosina y holo-ACP (Watson *et al.* 2002, von Bodman *et al.* 2003) (Figura 3).

A la fecha no existe la estructura cristalina de ExpI; sin embargo, se demostró previamente que la mayoría de los residuos homólogos en secuencias de AHL sintasas se encuentran en la misma cara de la enzima y se localizan en una hendidura del sitio activo aparente o en el extremo N desordenado. El resto de los residuos conservados Asp45, Asp48, Arg68, Glu97 y Arg100, se agrupan en una red de pares de iones que estabilizan la interacción del dominio N-terminal. Se ha reportado que Ser99 es un residuo clave en el centro de este grupo e interactúa con Arg68 y una molécula de agua que sirve como puente de unión con Glu97. Ser99 es un aminoácido conservado en las AHL sintasas tipo Lux y su importancia radica en su capacidad de abstracción de protones de la amina protonada de SAM mediante la estabilización del ion hidronio putativo lo que provoca que SAM a su vez interaccione con acil-ACP, dándose el proceso de acilación (Watson *et al.* 2002).

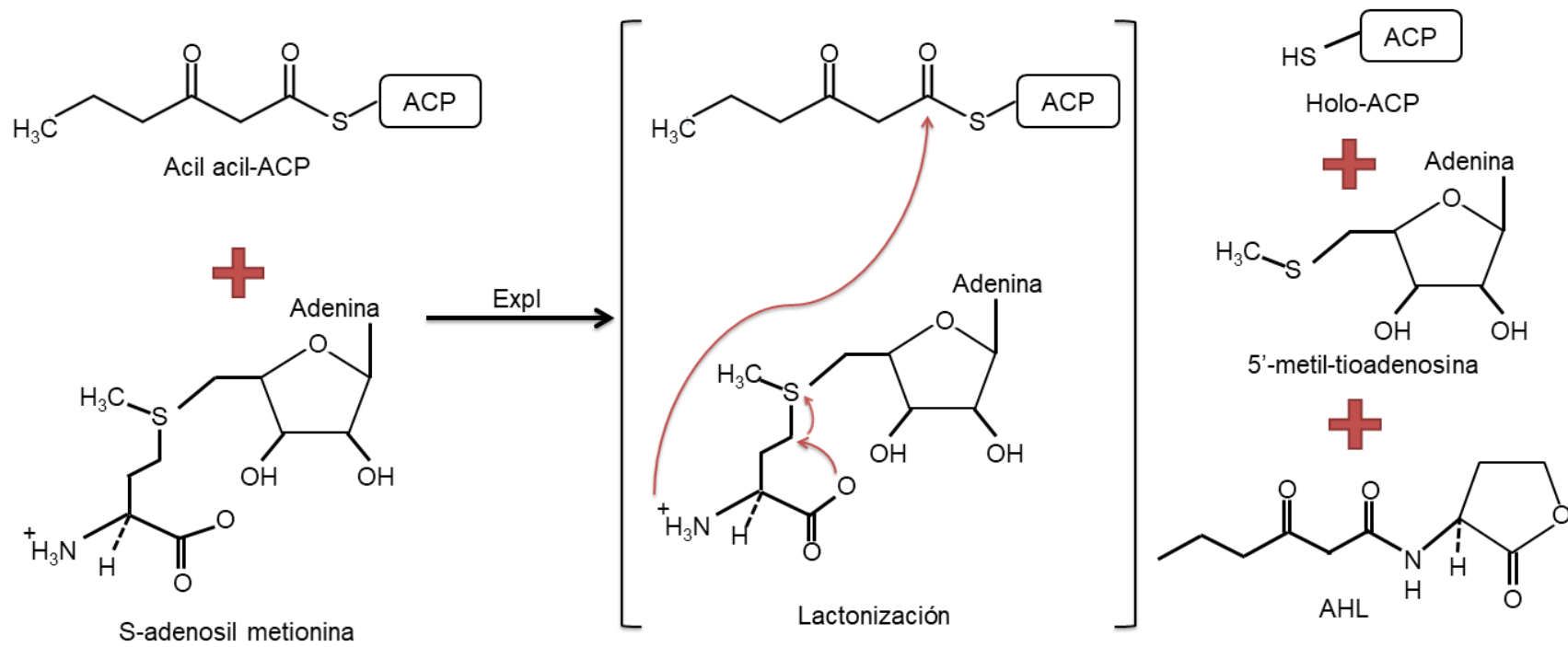


Figura 3. ExpI sintetiza AHL a partir de los sustratos SAM y acil-ACP mediante un proceso de acilación y lactonización.

Normalmente, en la mayoría de las bacterias Gram-negativas que utilizan este sistema de comunicación celular, cuando la concentración de AHL alcanza un nivel umbral, estas interactúan con proteínas receptoras tipo LuxR para formar un complejo activo con alta afinidad a secuencias de ADN específicas llamadas "*lux boxes*". Estas secuencias se encuentran en las regiones promotoras de varios genes en el regulón del QS y activan la expresión de sus respectivos factores de virulencia (von Bodman *et al.* 2003). El factor de virulencia expresado será dependiente del fitopatógeno y de las características estructurales de la molécula señal sensada ya que hay algunos fitopatógenos que presentan moléculas señal que difieren significativamente de las AHL (Cuadro 2).

En el caso de *P. carotovorum*, la proteína receptora (ExpR) no activa la expresión de factores de virulencia del mismo modo que otras bacterias fitopatógenas ya que funciona como un regulador negativo. ExpR1 y ExpR2 directamente inhiben la virulencia en ausencia de niveles umbral de AHL por regular positivamente *rsmA*. RsmA es una proteína que desestabiliza los transcritos de ARNm que codifican para las exoenzimas celulasa, pectato liasa y proteasa. A una alta concentración, 3-oxo-C8-AHL se une a ExpR1, mientras que 3-oxo-C6-AHL a ExpR2 y dicha unión inactiva ambas proteínas receptoras, inhibiendo la expresión de *rsmA* y dejando libres los transcritos de ARNm que codifican para las exoenzimas (Pöllumaa *et al.* 2012) (Figura 4). A la fecha, la mayoría de los estudios se ha enfocado a estudiar como el QS regula la síntesis de exoenzimas de *P. carotovorum* así como otros factores de virulencia como producción de antibióticos y motilidad.

Se sabe que este microorganismo forma biopelículas; sin embargo, no hay estudios que describan exactamente como es la ruta de regulación. Considerando que varias bacterias patógenas comparten similitudes genéticas, fisiológicas y de mecanismos de infección es posible hipotetizar como el QS regula la síntesis de SPE y por lo tanto la formación de biopelículas. En *Pantoea stewartii*, bacteria similar a *P. carotovorum* (en su proceso de infección y regulación de la virulencia), a bajas concentraciones de AHL (baja densidad celular) EsaR funge como un agente de unión al ADN y actúa como un represor directo de la transcripción de *rscA*, obteniéndose niveles basales de la proteína RcsA que es sujeta a degradación por la proteasa "Lon", previniendo la formación significativa del complejo de activación RcsA/RcsB.

Cuadro 2. Virulencia de bacterias fitopatógenas: sistemas QS, moléculas señal y factores de virulencia.

Fitopatógeno	Sistema QS	Molécula señal QS	Factores de virulencia	Referencias
<i>Xylella fastidiosa</i>	RpfF/C	Ácido 12-metil-tetradecanoico, DSF	Motilidad “twitching” y formación de biopelículas	Ionescu <i>et al.</i> (2013)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraI/R	3-oxo-C8-homoserina lactona	Conjugación plásmido Ti	Gohlke y Deeken (2014)
<i>Burkholderia glumae</i>	TofI/R	Octanoil-homoserina lactona	Toxoflavina, lipase y efectores tipo III	Kim <i>et al.</i> (2004)
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	ExpI/R, CarI/R	3-oxo-C6-homoserina lactona, 3-oxo-C8-homoserina lactona	Exoenzimas y producción de antibióticos	Crépin <i>et al.</i> (2012)
<i>Pectobacterium amylovorum</i>	EamI/R	3-oxo-C6-homoserina lactona	Síntesis de levan	Venturi <i>et al.</i> (2004); Koczan <i>et al.</i> (2009)
<i>Pantoea stewartii</i>	EsaI/R	3-oxo-C6-homoserina lactona	Síntesis de exopolisacáridos	Koutsoudis <i>et al.</i> (2006)
<i>Dickeya dadantii</i>	ExpI/R	3-oxo-C6-homoserina lactona	Producción de exoenzimas y exopolisacáridos	Nasser <i>et al.</i> (2013)
<i>Pseudomonas syringae</i>	AhII/R	3-oxo-C6-homoserina lactona	Producción de exopolisacáridos, elicitores de respuesta hipersensible, productos de genes antivirulencia, hormonas de crecimiento y fitotoxinas	Quiñones <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas corrugata</i>	PcoI/R	C6-homoserina lactona	Regulación de respuesta hipersensible, motilidad “swarming”, fitotoxinas y compuestos antimicrobianos (corpetina A y B y cormicina)	Licciardello <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	Pfsl/R, PfvI/R	C10 y C12-homoserina lactona, 3-oxo-C10 y 3-oxo-C12-homoserina lactona	Fitotoxinas	Mattiuzzo <i>et al.</i> (2011)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	PhcB/A	Ácido 3-hydroxi palmítico	Exopolisacáridos, motilidad y formación de biopelículas	Wang <i>et al.</i> (2016)
<i>Xanthomonas campestris</i>	RpfF/G	Ácido <i>cis</i> -11-metil-dodecenoico, DSF	Síntesis de endoglucanasa, protease y xantana	von Bodman <i>et al.</i> (2003)
<i>Xanthomonas oryzae</i>	RpfF/G	Ácido <i>cis</i> , <i>cis</i> -11-metil-dodeca-2,5-dienoico, CDSF	Exopolisacáridos, enzimas extracelulares sideroforos queladores de hierro y efectores de T3SS	Vidaver (2001); He <i>et al.</i> (2010)

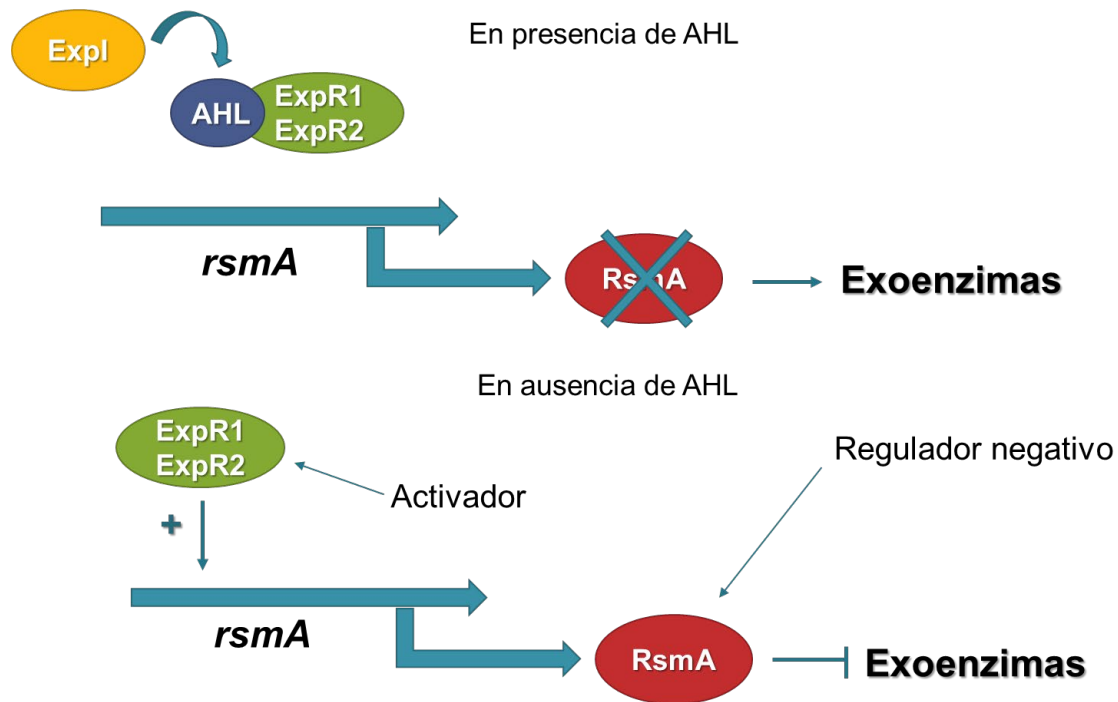


Figura 4. ExpR1 y ExpR2 regulan negativamente la síntesis de exoenzimas en *P. carotovorum* a través de la activación de RsmA.

Contrariamente, a una alta densidad celular, la actividad represora de EsaR se afecta lo que permite la expresión rápida del gen *rscA* y por lo tanto, los niveles de RcsA superan la capacidad de degradación de “Lon”. RcsA recluta a RcsB para formar un complejo de activación para la regulación por retroalimentación positiva de *rscA* y la activación del grupo de genes *cps*, relacionados con la síntesis de exopolisacáridos (Minogue *et al.* 2005) (Figura 5). Como se puede observar, la presencia de AHL determina la activación de la síntesis de factores de virulencia a través del efecto regulador de EsaR; es por esto que la proteína sintasa, encargada de la síntesis de AHL, es una enzima clave en el desarrollo de virulencia de *P. carotovorum*. Esto ha sido confirmado por Lee *et al.* (2013) quienes reportaron que cepas mutantes del gen *expI* no produjeron exoenzimas y se redujo la formación de biopelículas en un 77%. De manera similar, en *P. atrosepticum* la supresión del gen *expI* provocó una disminución de la abundancia de transcritos de las exoenzimas (*pnl*, *pel*, *peh*, *pme*, *cel* y *pri*).

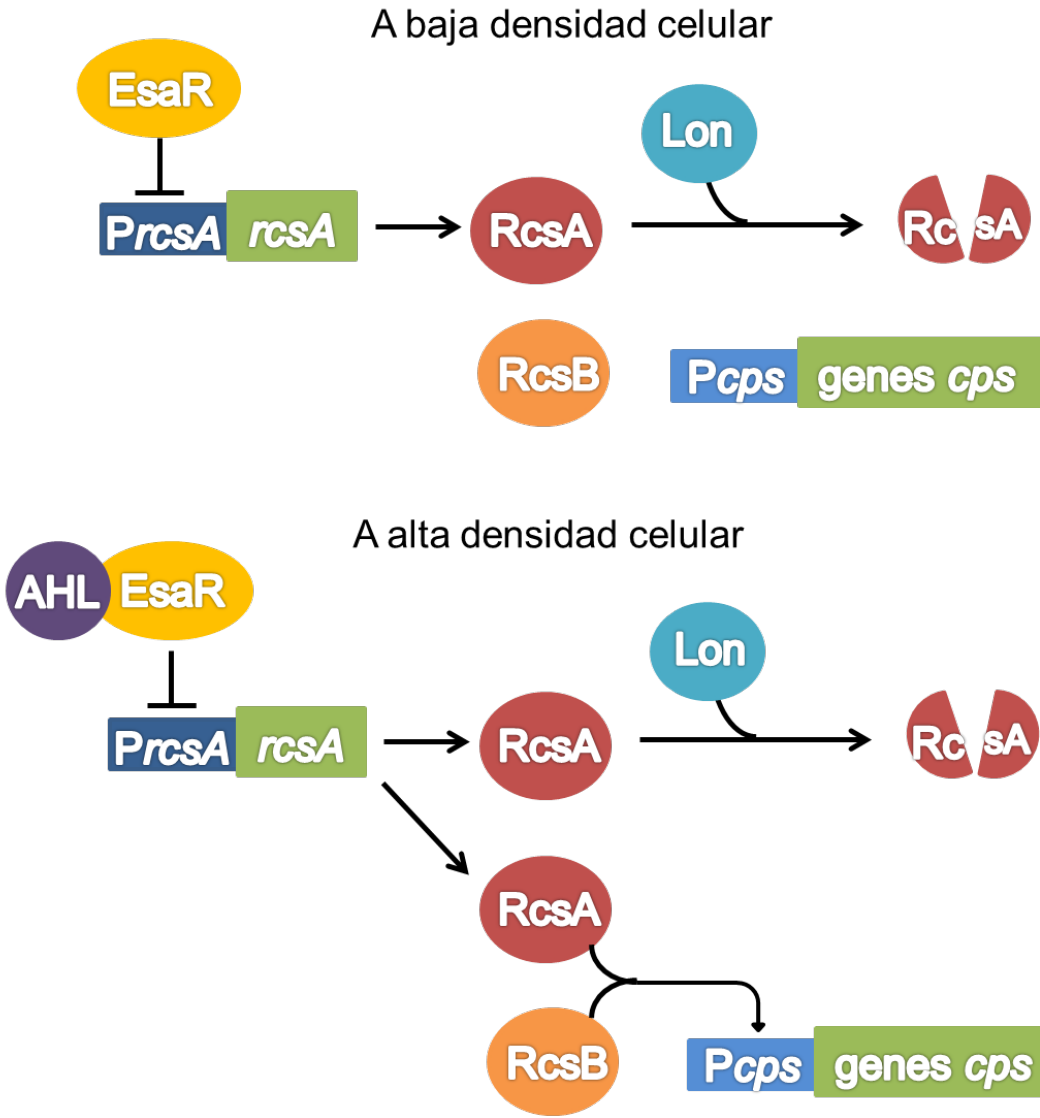


Figura 5. El QS regula la síntesis de polisacáridos en *P. stewartii* a través de la activación de la expresión de genes *cps*.

Por otra parte, von Bodman *et al.* (2003) encontraron que la supresión de este gen en *P. carotovorum* eliminaba la síntesis de AHL y la producción de SPE, lo cual se reflejó directamente en una reducción de la virulencia debido a que estos bloquean los xilemas de las plantas y causan marchitamiento. Por lo tanto, se han buscado compuestos que inhiban la síntesis de AHL a través de la afectación de la proteína sintasa. Esto ha sido confirmado por Lee *et al.* (2013) quienes reportaron que cepas mutantes del gen *expI* no produjeron exoenzimas y se redujo la formación de biopelículas en un 77%. De manera similar, en *P. atrosepticum* la supresión del gen *expI* provocó

una disminución de la abundancia de transcritos de las exoenzimas (*pnl*, *pel*, *peh*, *pme*, *cel* y *pri*). Por otra parte, von Bodman *et al.* (2003) encontraron que la supresión de este gen en *P. carotovorum* eliminaba la síntesis de AHL y la producción de SPE, lo cual se reflejó directamente en una reducción de la virulencia debido a que estos bloquean los xilemas de las plantas y causan marchitamiento. Por lo tanto, se han buscado compuestos que inhiban la síntesis de AHL a través de la afectación de la proteína sintasa.

2. 4. Extractos de Plantas y sus Principales Compuestos Atenúan la Virulencia de Bacterias Fitopatógenos

Los extractos de plantas han sido utilizados desde la antigüedad para el control de infecciones causadas por patógenos y han atraído la atención por sus propiedades antimicrobianas y anti-QS (Ortega-Ramirez *et al.* 2014). Estos presentan un variado contenido de compuestos fitoquímicos (compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos, terpenoides, etc.) que actúan como antibióticos naturales y muestran baja toxicidad. Los extractos de plantas se han estudiado extensamente debido a su capacidad para afectar la virulencia de patógenos humanos (Ahmer 2004, Joshi *et al.* 2015); sin embargo, se ha realizado poca investigación con patógenos de plantas. Los extractos de plantas medicinales, hierbas y especias, así como sus constituyentes principales actúan como agentes inhibidores del QS, lo que resulta en la inhibición de la motilidad, la adhesión, la síntesis y secreción de SPE, la síntesis de toxinas y formación de biopelículas de fitopatógenos (Ahmer 2004, Gutierrez-Pacheco *et al.* 2018). Estos compuestos presentan diferentes mecanismos de acción y por lo tanto pueden atacar diferentes puntos del QS.

Se ha reportado que los flavonoides sintetizados por plantas de tomate después de la infección por *P. syringae* reducen la motilidad y la expresión del T3SS relacionado con la liberación de factores de virulencia o proteínas efectoras dentro de las células de las plantas (Vargas *et al.* 2013). Por otra parte, la miel de castaño y su extracto acuoso a 200 mg/mL redujeron significativamente la formación de biopelículas de *P. carotovorum* en un 53.2 y un 66.4%, respectivamente; además, esta concentración redujo la producción de 3-oxo-C6-AHL en un 45-50% (Truchado *et al.* 2009). Lagonenko *et al.* (2013) reportaron que el ácido salicílico inhibió la formación de biopelículas, la

motilidad y la síntesis de AHL de *P. carotovorum* y *P. syringae* a concentraciones de 25 y 50 mM, respectivamente.

Pocos estudios se han centrado en el potencial de los aceites esenciales de plantas y sus constituyentes principales para inhibir los mecanismos del QS y la síntesis de factores de virulencia de fitopatógenos. Se reportó previamente que los aceites esenciales de canela, lavanda, eucalipto y tomillo (0.25-1 ppm) redujeron significativamente la formación de biopelículas y la motilidad (swimming, swarming y twitching) de *R. solanacearum* (Hosseinzadeh *et al.* 2013). El cinamaldehído, principal terpeno del aceite esencial de canela, redujo la concentración de C6-AHL en *P. carotovorum* a una concentración de 0.05 mg/mL (Truchado *et al.* 2012). Por otro lado, Joshi *et al.* (2016) evaluaron el efecto de eugenol (250 µM) sobre *P. carotovorum* subsp. *brasilense* y observaron una reducción en la formación de biopelículas y la expresión de genes de exoenzimas (*pel*, *peh*, *pri*), reduciendo la infección de los tejidos de plantas. Zhang *et al.* (2018) informaron que carvona, carvacrol, citral, geraniol, timol, eugenol y cinamaldehído a concentraciones de 0.1 mg/mL inhibieron significativamente la motilidad (swimming, swarming y twitching), síntesis de SPE y formación de biopelículas de *P. carotovorum*. Además, estos autores hipotetizaron que el efecto de los terpenoides podría atribuirse a una inhibición del QS, debido a la reducción de la síntesis de violaceína en la cepa biosensora *Chromobacterium violaceum* (CV026) expuesta los tratamientos.

Los mecanismos propuestos de estos compuestos naturales para interrumpir el QS se han relacionado con una inhibición de la expresión génica y de la actividad de las enzimas productoras y sensoras de moléculas señal, y con una interacción directa con la molécula señal. Sin embargo, estos compuestos deben tener afinidad estérica y electrostática con las posibles dianas moleculares antes mencionadas. Es bien sabido que en la mayoría de las bacterias Gram-negativas, las proteínas sintasas y receptoras se encuentran en el citoplasma; por lo que los compuestos inhibidores deben atravesar una serie de barreras para poder llegar a cumplir su acción.

Por lo tanto, los compuestos inhibidores deben tener un cierto tamaño y polaridad para atravesar la membrana e interactuar con estas proteínas. Además, se ha reportado que algunos compuestos vegetales, debido a sus características moleculares como la anfipaticidad, pueden interactuar con proteínas a través de interacciones hidrófobas o puentes de hidrógeno (Chang *et al.* 2014). Hay varias formas en las que compuestos de esta naturaleza podrían interactuar con estas proteínas: interacción con el sitio activo o en cualquier otro lugar que produzca cambios estructurales y afecte

su función. Como se mencionó anteriormente, un factor importante dentro del QS es la síntesis de AHL por la sintasa ExpI; por lo tanto, los compuestos naturales pueden ser dirigidos a interferir con el reconocimiento del sustrato por la enzima.

2.5. Carvacrol como Inhibidor de la Comunicación Intercelular, Formación de Biopelículas y Síntesis de Exoenzimas

El carvacrol es un compuesto terpenoide presente en el aceite esencial de orégano al cual se le ha atribuido un alto potencial antimicrobiano (Tapia-Rodriguez *et al.* 2017). Esto se ha relacionado a sus características hidrofóbicas (Log P= 3.49) las cuales le permiten embeberse en la membrana celular, provocando su desestabilización, pérdida de constituyentes celulares y la muerte celular (Gutierrez-Pacheco *et al.* 2018). Se ha reportado que el carvacrol reduce la síntesis de factores de virulencia de diversas bacterias patógenas; sin embargo, la información acerca de su efecto en fitopatógenos es escasa. Burt *et al.* (2014) reportaron que el carvacrol redujo la formación de biopelículas de *C. violaceum*, *S. Typhimurium* y *S. aureus* (a una concentración subinhibitoria <0.5 mM). Adicionalmente, el carvacrol redujo la expresión del gen *cviI* (que codifica para AHL sintasa), producción de violaceína y actividad de quitinasa (regulados por el QS) a concentraciones que coinciden con el efecto inhibitorio del carvacrol sobre la formación de la biopelícula. Por otra parte, Tapia-Rodriguez *et al.* (2017) observaron una reducción en la formación de biopelículas, producción de piocianina y AHL en *P. aeruginosa* a concentraciones entre 0.9-3.9 mM y este efecto fue atribuido a un posible efecto del carvacrol sobre la expresión del gen *lasR* y un efecto postraduccional sobre la proteína sintasa LasI.

Aunque existe poca evidencia acerca del carvacrol sobre los patógenos de plantas y aún menos sobre *P. carotovorum*, hay estudios donde se reporta que el carvacrol afecta la síntesis de algunos factores de virulencia de *P. carotovorum* subsp. *brasilense* (Joshi *et al.* 2016). Estos autores concluyen que el efecto inhibitorio del carvacrol podría ser atribuido a una afectación del sistema QS, particularmente en las proteínas ExpI/ExpR. A la fecha no se ha purificado ni cristalizado la proteína ExpI de *P. carotovorum*; sin embargo, en base a proteínas homólogas como EsaI de *P. stewartii* ha sido posible hipotetizar sobre los posibles lugares de unión con el carvacrol. Algunos puntos clave durante este proceso son el reconocimiento de la cadena de acilo, así como la presencia

del aminoácido Ser99 en el centro catalítico. Este es un residuo clave ya que interacciona directamente con Arg68 y forma un puente con una molécula de agua directamente unida a Glu97, además de ser un aminoácido conservado en la familia de las AHL sintasas. Previamente se reportó que la cadena de acilo encaja perfectamente en una cavidad hidrofóbica en la estructura de EsaI e interactúa con los residuos conservados Ser98, Met126, Thr140, Val142, Met146 y Leu176 que alinean esta cavidad y la colocan en la orientación adecuada para la catálisis (Figura 6) (Watson *et al.* 2002).

Se ha reportado que J8-C8 (N-(3-oxociclohex-1-enil) octanamida), compuesto estructuralmente similar al carvacrol, inhibió la síntesis de AHL debido a su capacidad para interactuar con la proteína sintasa TofI del fitopatógeno *Burkholderia glumae*. El análisis de la estructura cristalina de rayos X mostró que este compuesto se une a TofI y ocupa el sitio de unión de la cadena de acilo. Por otra parte, mediante modelaje molecular se demostró que el trans-cinamaldehído interacciona con Phe27 y Trp33 de la AHL sintasa LasI de *P. aeruginosa* y forma un enlace de hidrógeno con Arg30 (Chang *et al.* 2014). Además, forma interacciones hidrofóbicas y Pi-Pi con Phe105 ubicado en el túnel hidrofóbico abierto; mientras que en EsaI (de *P. stewartii*), se forman dos enlaces de hidrógeno con Arg100 y Phe101 (Chang *et al.* 2014). Estos residuos se conservan entre la familia LuxI, lo que sugiere que moléculas similares podrían interactuar con AHL sintasas de fitopatógenos.

A pesar de que existen estudios previos sobre el efecto del carvacrol sobre los factores de virulencia en diferentes bacterias patógenas, es importante resaltar que se desconoce cuál es su efecto en *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Por lo tanto surge la interrogante de ¿cuál es el efecto del carvacrol sobre el proceso de formación de biopelículas, síntesis de exoenzimas y otros factores de virulencia de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*? y como se relaciona esto con la reducción en la síntesis de AHL. Basándonos en la importancia de las AHLs en la expresión de factores de *P. carotovorum* y considerando la evidencia previa que muestra el efecto anti-QS del carvacrol, es posible hipotetizar que dadas sus características químico-estructurales y actividad, este pueda afectar la síntesis de AHL por una posible interacción con la proteína ExpI.

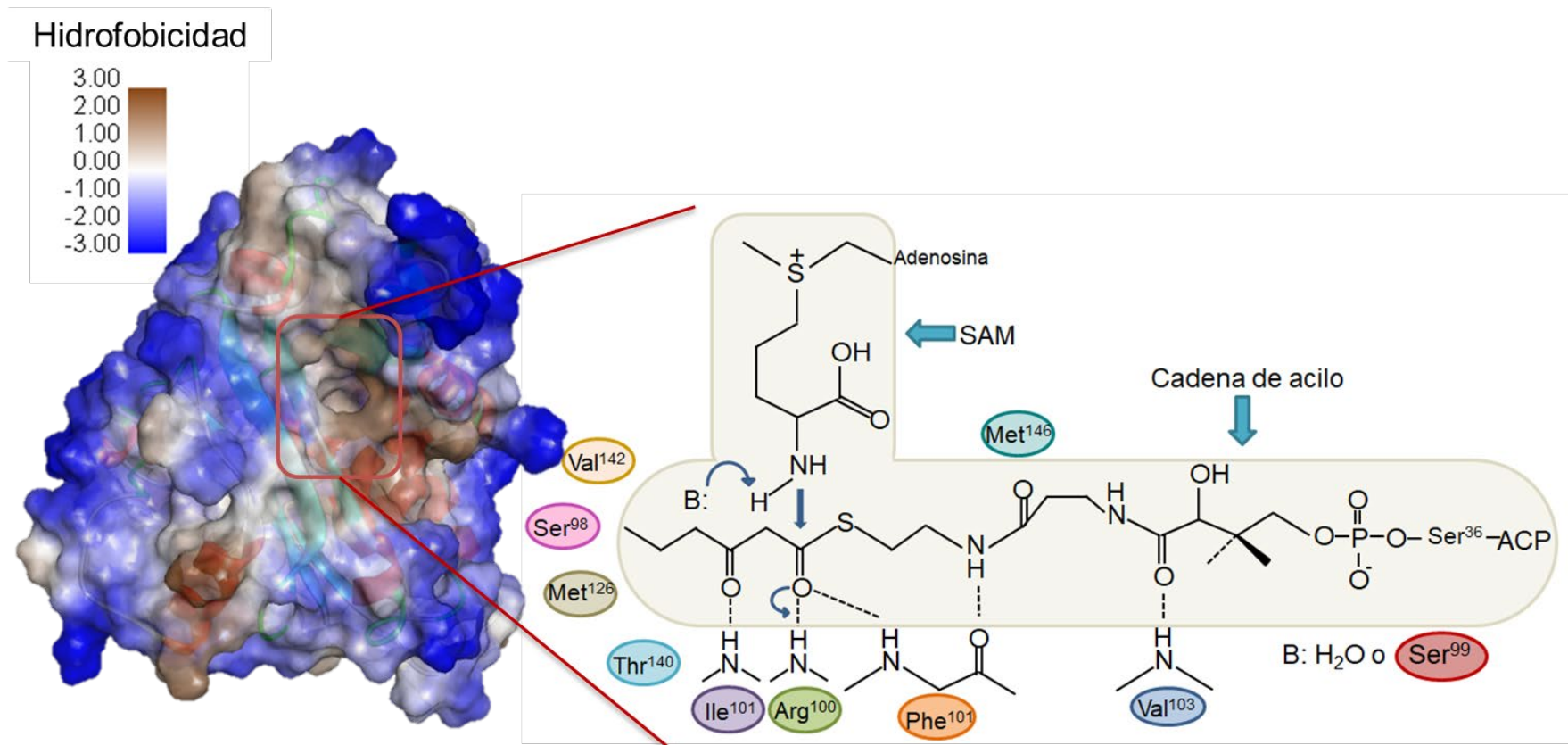


Figura 6. Cavity hidrofóbica de ExpI donde se lleva a cabo el reconocimiento de la cadena de acilo transportada por ACP y el proceso de N-acilación mediante el ataque nucleofílico entre el grupo amino desprotonado de SAM y el 1-carbono carbonilo de la cadena de acilo. Los aminoácidos conservados e implicados en el reconocimiento a sustrato y catálisis se muestran en colores. Modificado de Watson *et al.* (2002).

3. HIPÓTESIS

El carvacrol presenta un efecto inhibitorio sobre la producción de exoenzimas y formación de biopelículas de *Pectobacterium carotovorum* atribuido al bloqueo en la síntesis de AHL.

4. OBJETIVOS

4. 1. Objetivo General

Evaluar el efecto del carvacrol sobre el proceso de formación de biopelículas, síntesis de exoenzimas, motilidad y síntesis de acil homoserina lactonas de *P. carotovorum*.

4. 2. Objetivos Específicos

Analizar el efecto del carvacrol sobre el proceso de formación de biopelículas de *P. carotovorum*.

Determinar el efecto del carvacrol sobre la producción de exoenzimas de *P. carotovorum*.

Determinar el efecto del carvacrol sobre la síntesis de AHL de *P. carotovorum*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Etapa 1: Evaluación del Efecto del Carvacrol Sobre el Proceso de Formación de Biopelículas de *P. carotovorum*.

5.1.1. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Bactericidas (CMB) y de Formación (CMIB) y Erradicación (CMEB) de Biopelículas de *Pectobacterium carotovorum* Expuestas a Carvacrol

La actividad antibacteriana del carvacrol (98% purity, Sigma Aldrich, EE. UU.) contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (ATCC 15713) se evaluó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) (NCCLS 2001), con algunas modificaciones. Para el ensayo, se disolvieron diferentes concentraciones de carvacrol (0-6.65 mM) en caldo Luria Bertani (LB) con etanol (5%, para mejorar la disolución). Posteriormente, se inocularon los tubos con *P. carotovorum* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL, se mezclaron y se incubaron a 28 °C por 24 h. La CMI se determinó como la concentración más baja de carvacrol que inhibió el crecimiento visual de las bacterias inoculadas. De los tubos sin crecimiento visible, se colocaron 20 μ L en placas de agar LB y la concentración más baja con ausencia de viabilidad se consideró como la CMB. Adicionalmente, se determinó una concentración de carvacrol (por debajo de la CMI) que no afectara la viabilidad celular (con la finalidad de determinar su posible mecanismo de acción), midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm en un lector de microplacas FLUOstar OMEGA (BMG Labtech, Chicago, IL, EE. UU.) durante 24 h a 28 °C.

Por otro lado, las concentraciones de carvacrol necesarias para inhibir y erradicar las biopelículas de *P. carotovorum* se clasificaron como CMIB y CMEB, respectivamente (Chamdit y Siripermpool 2012). Para la CMIB, se formaron biopelículas en cupones de polipropileno ($1 \times 1 \times 0.1$ cm) (Wenco®) completamente sumergidos en 6 mL de caldo LB que contenía diferentes concentraciones de carvacrol (0–2.66 mM) que no afectaron la viabilidad del inóculo. Los tubos se inocularon con 1×10^6 CFU/mL de *P. carotovorum* y se incubaron a 28 °C durante 24 h. Posteriormente, los cupones se retiraron, se lavaron con solución salina estéril (2 mL) y se

sonicaron durante 5 min (40 kHz, Branson 2510 sonicator, CT, EE.UU.) en 3 mL de solución salina estéril. Se realizaron diluciones en serie, se inocularon en placas de agar LB y se incubaron a 28 °C por 24 h. La concentración mínima a la cual no se recuperaron células adheridas de los cupones se consideró como el CMIB.

Para determinar la CMEB del carvacrol se formaron biopelículas como se mencionó anteriormente, en caldo LB sin carvacrol durante 24 h, se lavaron los cupones con solución salina estéril para eliminar las células débilmente adheridas y luego se expusieron (30 min) a diferentes concentraciones de carvacrol (0–6.65 mM). Los cupones se sonicaron en 3 mL de solución salina estéril, se diluyeron en serie, se sembraron en agar LB y se incubaron a 28 °C por 24 h. La concentración mínima donde no se detectaron células viables adheridas se consideró como la CMEB. Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.1.2. Efecto del Carvacrol sobre la Motilidad de *P. carotovorum*

Con el propósito de observar cambios en la motilidad de *P. carotovorum* por efecto del carvacrol, se utilizó la concentración de 0.66 mM (concentración seleccionada en el ensayo antibacteriano descrito en la sección 4.1.1.) y se determinó la motilidad tipo swimming en placas con agar LB semisólido (Hossain, Shibata, Aizawa y Tsuyumu, 2005). Para esto, se inocularon 20 µL de 1×10^6 UFC/mL de *P. carotovorum* crecido en ausencia (control) y presencia de carvacrol (0.66 mM) en el centro de una placa de agar LB semisólido (0.3%). Posteriormente, las placas se incubaron a 28 °C y se midió el área de motilidad después de 24 h de incubación, expresando los resultados en mm. El experimento se realizó por triplicado.

5.1.3. Carga Superficial Bacteriana de *P. carotovorum* Expuesta a Carvacrol

Se llevaron a cabo experimentos de potencial zeta (Nano-ZS 90, Malvern instrument, Malvern, UK) con la finalidad de evaluar cambios en la carga superficial bacteriana después de la exposición

a carvacrol. Para el ensayo, 1×10^6 UFC/mL de *P. carotovorum* se inocularon en tubos conteniendo 6 mL de caldo LB y carvacrol (0.66 mM) y se incubaron a 28 °C por 24 h. Después, los cultivos se centrifugaron a $6000 \times g$ por 10 min, se lavaron dos veces y se re-suspendieron en agua estéril; la suspensión de células no tratadas se usó como control y los resultados se expresaron como milivoltios (mV). Todos los experimentos se realizaron por triplicado a 25 °C.

5.1.4. Energía Libre de Adhesión de *P. carotovorum* Expuesta al Carvacrol

El proceso de adhesión bacteriana a superficies abióticas se puede predecir mediante un enfoque termodinámico calculando el cambio en la energía libre de adhesión (ΔG_{adh}) (Absolom *et al.* 1983). Este se puede estimar a partir de la energía superficial de las bacterias (γ^{bv}), la superficie de adhesión (γ^{sv}) y el entorno donde realizan este proceso (γ^{lv}) (el superíndice *v* representa la fase de vapor en la que se determina la energía de la superficie), utilizando la siguiente fórmula (Kwok y Neumann 1999):

$$\Delta G_{adh} = 2\sqrt{\gamma^{bv}\gamma^{lv}e^{-\beta(\gamma^{bv}\gamma^{lv})^2}} + 2\sqrt{\gamma^{sv}\gamma^{lv}e^{-\beta(\gamma^{sv}\gamma^{lv})^2}} - 2\sqrt{\gamma^{bv}\gamma^{sv}e^{-\beta(\gamma^{bv}\gamma^{sv})^2}} - 2\gamma^{lv}$$

La energía superficial de la solución salina (γ^{lv}) y el polipropileno (γ^{sv}) utilizados en los experimentos de adhesión fue de 65.3 y 48.17 mJ/m², respectivamente. Estos se determinaron con un tensiómetro (CSC-Du Nouy, No. 70535) y mediante el método de gota sésil usando un goniómetro óptico CAM-Plus Micro, Tantec (Schaumburg, IL, EE. UU.), en conjunción con la ecuación de estado de Neumann (Kwok y Neumann 2000), respectivamente.

La energía superficial de *P. carotovorum* (γ^{bv}) se determinó mediante el método espectrofotométrico descrito por Vazquez-Armenta *et al.* (2018). Este método se basa en el análisis de la estabilidad coloidal de las suspensiones bacterianas. El nivel de dispersión de las células en el fluido se puede determinar midiendo la DO de la suspensión, ya que una mayor DO se relaciona

con menos sedimentación y mayor dispersión. Para el procedimiento experimental, se preparó un inóculo de *P. carotovorum* a partir de un cultivo en fase exponencial (18 h a 28 °C). El cultivo se centrifugó a 3600 x g durante 3 min y el sedimento se lavó con solución salina (3 veces). Luego, las células bacterianas se resuspendieron en solución salina (1 mL), se agitaron por 1 min y se sonicaron (1 min) para obtener una suspensión homogénea de aproximadamente 1×10^{10} UFC/mL. Posteriormente, para observar el efecto del carvacrol sobre la energía de adhesión de *P. carotovorum*, la suspensión bacteriana se puso en contacto con 0.66 mM de carvacrol durante 2 h, se centrifugó a 3600 x g durante 3 min y también se resuspendió en solución salina (1 mL) para obtener la misma concentración de inóculo. Por otro lado, se determinaron los valores de tensión superficial de 11 mezclas binarias de etanol-agua (100: 0, 90:10, 70:30, 40:60, 20:80, 10.8:89.2, 7:93, 4:96, 1.8:98.2, 0.6:99.4 y 0:100 v/v) con un tensiómetro para obtener valores entre 23 y 76 mJ/m². Posteriormente, se tomaron 100 µL de las suspensiones de *P. carotovorum* (no expuestas y expuestas a carvacrol) y se mezclaron con 500 µL de cada solución, se agitaron en vórtex y se mantuvieron a 25 °C durante 20 min. Luego, las suspensiones se centrifugaron a 200 × g durante 6 min para eliminar los sedimentos del sobrenadante.

Finalmente, se tomaron 150 µL de cada suspensión y se transfirieron a una microplaca de poliestireno de 96 pozos (COSTAR®, NY, EE. UU.) y se leyó la DO en un lector de microplacas a una longitud de onda de 600 nm. La DO de las suspensiones se representó en función de sus respectivos valores de tensión superficial y el valor máximo de dispersión se determinó mediante un ajuste polinomial de tercer orden (Zhang *et al.* 2015). Las lecturas de absorbancia se realizaron por triplicado, mientras que todo el experimento se repitió dos veces y los resultados se expresaron como mJ/m². A partir de la energía superficial de las bacterias (expuestas o no al carvacrol) (γ^{bv}), la superficie de adhesión (polipropileno) (γ^{sv}) y el entorno en el que llevan a cabo este proceso (solución salina) (γ^{lv}), se calculó el ΔG_{adh} entre las bacterias y la superficie de polipropileno usando la ecuación antes mencionada.

5.1.5. Efecto del Carvacrol sobre la Formación de Biopelículas y Secreción de SPE de *P. carotovorum*

El efecto del carvacrol y el tiempo de incubación en la formación de biopelículas de *P. carotovorum* se evaluó midiendo las células viables adheridas a cupones de polipropileno. Para el ensayo, se inocularon 6 mL de caldo LB (conteniendo carvacrol a una concentración de 0.66 mM) con 1×10^6 UFC/mL de *P. carotovorum* y se incubaron a 28 °C por 24 h. Posteriormente, a diferentes tiempos de incubación (0.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h), los cupones se retiraron, se lavaron con solución salina estéril (2 mL) y se sonicaron (40 kHz) durante 5 min en 3 mL de solución salina estéril. Se realizaron diluciones en serie, se cultivaron en agar LB incubando a 28 °C durante 24 h. El análisis se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como log UFC/cm². Por otra parte, se formaron biopelículas en placas de poliestireno para permitir el análisis de microscopía óptica a las 2, 6, 12 y 24 h de incubación a 28 °C; cada muestra se tiñó con una solución de cristal violeta al 0,1%, se fijó durante 10 min, se lavó para eliminar el exceso de tinte y se secó antes de la observación a un aumento de 600x utilizando un microscopio invertido Axiovert (Carl Zeiss, NY, EE. UU.).

Se evaluó el efecto del carvacrol y el tiempo de incubación en la síntesis de SPE durante la formación de biopelícula. Se extrajeron las SPE después del lavado de las superficies de polipropileno con solución salina estéril (2 mL) para eliminar las células adheridas débilmente. Luego, las superficies se introdujeron en tubos que contenían 5 mL de agua destilada y se agregaron 30 µL de formaldehído y se dejaron a 4 °C durante 1 h. Posteriormente, se agregaron 2 ml de NaOH (1 N) a los tubos, se sonicaron durante 10 min (40 kHz) y se almacenaron a 4 °C durante 3 h. Finalmente, la solución de SPE se filtró a través de una membrana de 0.2 µm, se purificó con una membrana de diálisis de celulosa (3500 Da) (Sigma Aldrich, Pierce, EE. UU.) a 4 °C durante 24 h y la fracción > 3500 Da se liofilizó a -150 °C durante 48 h para su posterior análisis (Liu y Fang 2002).

El contenido de polisacáridos se determinó mediante el método de microplaca establecido por Masuko *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Para el ensayo, la muestra de SPE se disolvió en 50 µL de agua ultrapura (Milli-Q®), se mezcló con 150 µL de ácido sulfúrico concentrado y 30 µL de fenol al 5% (p/v) en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Posteriormente, la microplaca se incubó durante 5 min a 90 °C en un baño de agua estático y se enfrió a temperatura ambiente

durante otros 5 min. La absorbancia se registró a 490 nm en un lector de microplacas y los resultados se expresaron como μg de equivalentes de glucosa por cm^2 ($\mu\text{g EG}/\text{cm}^2$) en base a una curva estándar de glucosa usando la ecuación $y= 0.0091x-0.2688$. Por otro lado, el contenido de proteínas se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford 1976). Para el ensayo, se agregaron 120 μL de solución de SPE a una microplaca de 96 pocillos por triplicado y, posteriormente, se agregaron 30 μL de reactivo de Bradford a cada pocillo. La DO se midió a 562 nm en un lector de microplacas y los resultados se expresaron en μg de equivalentes de albúmina por cm^2 ($\mu\text{g EA}/\text{cm}^2$) en base a una curva estándar de albúmina de suero bovino usando la ecuación $y= 0.016232x-0.09231$. Los experimentos se realizaron por duplicado.

5.1.6. Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño por bloques completos al azar para evaluar el efecto del carvacrol y el tiempo de incubación (0.5, 2, 4, 6, 12, 24 y 48 h, el cual se bloqueó para observar el efecto del carvacrol) en la adhesión celular ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$), contenido de polisacáridos ($\mu\text{g EG}/\text{cm}^2$) y proteínas ($\mu\text{g AE}/\text{cm}^2$) en las biopelículas. Por otra parte, se aplicó un diseño completo al azar para evaluar el efecto del carvacrol sobre la motilidad (mm), la carga superficial bacteriana (mV), la energía superficial (mJ/m^2) y el potencial de adhesión (ΔG_{adh}). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$) para estimar las diferencias significativas y se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de medias ($p \leq 0.05$) utilizando el software estadístico NCSS 2007.

5.2. Etapa 2: Efecto del Carvacrol Sobre la Producción de Exoenzimas de *P. carotovorum*

5.2.1. Inhibición de la Actividad de Exoenzimas de *P. carotovorum* Expuesta a Carvacrol

Con la finalidad de evaluar si el carvacrol inhibe la producción de exoenzimas de *P. carotovorum*, se determinó la actividad de pectato liasa, poligalacturonasa y pectin metil esterasa en el medio de cultivo libre de células. La actividad poligalacturonasa se determinó midiendo la liberación de

azúcares reductores por la hidrólisis del ácido poligalacturónico (PGA) usando el reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS) reportado por Miller (1959). Para esto, se hizo crecer *P. carotovorum* (1×10^6 UFC/mL) en presencia de carvacrol (0.66 mM) por 24 h a 37 °C y después los cultivos se centrifugaron a $10000 \times g$ por 15 min a 4 °C. Se tomaron 100 μ L de los sobrenadantes y se mezclaron con 200 μ L de PGA (0.5% v/v) en Tris-HCl 50 mM (pH 8) y se incubaron a 40 °C por 30 min. La absorbancia del producto de reacción (azúcar reductor) se cuantificó a 540 nm usando ácido D-galacturónico como estándar. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ácido D-galacturónico por min.

La actividad pectato liasa se determinó midiendo los oligosacáridos insaturados liberados como resultado de la rotura del PGA usando ácido tiobarbitúrico (TBA). Para esto, 100 μ L de los sobrenadantes se agregaron a 500 μ L de PGA (0.5% v/v) en Tris-HCl 50 mM (pH 8) conteniendo 0.5 mM de CaCl_2 y se incubaron a 50 °C por 1 h. La reacción se detuvo poniendo las muestras en hielo y posteriormente se midió la absorbancia de la reacción con TBA a 550 nm. Una (U) se definió como la cantidad de enzima que causa el cambio de 0.01 en la absorbancia (Shau-Ping *et al.* 1985). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se cuantificó el contenido de proteína por el método de Bradford (Bradford 1976), expresando los resultados como U/mg de proteína.

5.2.2. Análisis de Modelaje Molecular Entre el Carvacrol y las Exoenzimas de *P. carotovorum*

Con la finalidad de poder atribuir el efecto inhibitorio del carvacrol a una reducción en la síntesis de exoenzimas y no a una inhibición enzimática por interacción con las mismas, se determinó si existen interacciones entre el carvacrol y el sitio catalítico de las enzimas poligalacturonasa y pectato liasa. Para esto, se usaron las estructuras cristalográficas de la poligalacturonasa (PDB 1BHE) de *P. carotovorum* y un modelo estructural de pectato liasa (construido en el software Homology/analogY Recognition Engine V. 2.0, Phyre2, a partir de la secuencia aminoacídica reportada la proteína). El mejor modelo seleccionado fue el de pelC de *D. chrysanthemi* con la cual mostró un 75% de identidad. El análisis de acoplamiento molecular se realizó utilizando la aplicación AutoDock Vina para obtener la energía de afinidad (kcal/mol) utilizando el software UCSF Chimera versión 11.2. Una vez obtenida la mejor pose (menor energía), se utilizó el software

Discovery Studio para identificar los aminoácidos y el tipo de interacción entre las proteínas y el carvacrol (Pettersen *et al.* 2004).

5.2.3. Efecto del Carvacrol sobre la Patogenicidad *In Vivo* de *P. carotovorum* en Tejidos de Papa

Con la finalidad de determinar el efecto del carvacrol en la incidencia de la enfermedad causada por *P. carotovorum*, se llevó a cabo un ensayo de patogenicidad *in vitro* en base a la metodología reportada por Dong *et al.* (2004), con algunas modificaciones. Para esto, se obtuvieron papas de un mercado local, las cuales fueron desinfectadas sumergiéndolas por 30 min en una solución clorada (200 ppm), enjuagadas con agua destilada estéril, rociadas con etanol al 70% y sacadas a temperatura ambiente. Posteriormente, se cortaron en rebanadas de 4-5 mm de grosor y se les hizo una pequeña incisión en el centro donde fueron inoculadas con 20 μ L de 1×10^6 UFC/mL de *P. carotovorum* (cultivado en ausencia y presencia de 0.66 mM de carvacrol). Además, se evaluó el efecto del carvacrol en fase de vapor, colocando el compuesto en discos de papel de 0.5 cm de diámetro. Los tejidos se colocaron en placas Petri conteniendo papel filtro humedecido con agua destilada estéril para favorecer un ambiente húmedo y se incubaron a 28 °C por 24, 48, 72 y 96 h. Se determinó visualmente el % de tejido dañado y se cuantificó la carga bacteriana mediante conteo en placa. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como % de tejido dañado y log UFC/g de muestra.

5.2.4. Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completo al azar para evaluar el efecto del carvacrol sobre la actividad poligalacturonasa, pectato liasa y pectin metil esterasa expresada como U/mg de proteína, así como sobre la maceración en tejidos de papa (%) y carga bacteriana (log UFC/g). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$) para estimar las diferencias significativas y se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de medias ($p \leq 0.05$) utilizando el software estadístico NCSS 2007.

5.3. Etapa 3: Efecto del carvacrol sobre la proteína ExpI encargada de la síntesis de AHL

5.3.1. Producción de AHLs por *P. carotovorum* expuesto a carvacrol

Con la finalidad de determinar el efecto del carvacrol sobre el QS de *P. carotovorum* se cuantificó el contenido de AHLs en cultivos expuestos a carvacrol mediante cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (UPLC-PDA por sus siglas en inglés). Para esto, se partió de cultivos de *P. carotovorum* (18 h), de los cuales se inoculó 1×10^6 UFC/mL en tubos con caldo LB (35 mL) adicionados con 0.66 mM de carvacrol, los cuales se incubaron a 28 °C por 24 h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a $10000 \times g$ por 15 min a 4 °C en una centrífuga Allegra 64R (Hettich, Tuttlingen, Alemania). Los sobrenadantes se filtraron (0.22 µm) y las AHL se extrajeron dos veces (1:1) con etil acetato acidificado (0.1% de ácido fórmico). Las fases orgánicas se juntaron y evaporaron a sequedad a 30 °C. Posteriormente, los sólidos se disolvieron en 1 mL de metanol para su posterior análisis.

El análisis de las AHLs se llevó a cabo en un cromatógrafo Waters UPLC (Milford, MA, EUA) equipado con un detector de arreglo de diodos 2996 y una columna BEH C18 (1.7 µm, 100 mm x 3 mm). La temperatura del termostato de la columna y del muestreador automático se ajustó a 60 °C y 27 °C, respectivamente. El caudal fue de 0.5 mL/min y el volumen de inyección de 5 µL. Las fases móviles (A y B) fueron agua y metanol acidificados al 0.1% con ácido acético glacial, respectivamente. Se aplicó un gradiente lineal comenzando con B al 20%, el cual se incrementó a 100% en 5 min. La longitud de onda de detección se estableció en 198 nm. La identificación se realizó comparando los tiempos de retención con los estándares 3-oxo-C6-AHL y 3-oxo-C8-AHL y sus espectros de absorción UV; mientras que la cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de 10 puntos de las moléculas correspondientes. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como µM de AHL.

5.3.2. Análisis de Modelaje Molecular de ExpI con Carvacrol

El modelo estructural de ExpI se construyó utilizando el software Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (Phyre2) a partir de la secuencia proteica depositada en la base de datos UniProt (número de acceso: A8DB99). El mejor modelo seleccionado fue el de EsaI (homoserina lactona sintasa) de *P. stewartii* (43% de identidad de secuencia; PDB 1KZF) como la estructura de referencia. El análisis de acoplamiento molecular se realizó utilizando la aplicación AutoDock Vina para obtener la energía de afinidad (kcal/mol) y la desviación de la raíz cuadrada de la media (RMSD) entre ExpI y SAM (ligando natural) y carvacrol (inhibidor) utilizando el software UCSF Chimera versión 11.2. Una vez obtenida la mejor pose (menor energía), se utilizó el software Discovery Studio para identificar los aminoácidos y el tipo de interacción entre ExpI y carvacrol (Pettersen *et al.* 2004).

5.3.3. Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completo al azar para evaluar el efecto del carvacrol sobre la síntesis de AHL (mM). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$) para estimar las diferencias significativas entre los tratamientos utilizando el software estadístico NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Etapa 1: Evaluación del Efecto del Carvacrol sobre el Proceso de Formación de Biopelículas de *P. carotovorum*.

6.1.1. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Bactericidas (CMB) y de Formación (CMIB) y Erradicación de Biopelículas de *Pectobacterium carotovorum* Expuestas a Carvacrol

Se evaluó el efecto antibacteriano del carvacrol contra células planctónicas de *P. carotovorum* y se determinó que la CMI del crecimiento planctónico fue de 2.66, mientras que la concentración mínima para matar las células fue de 3.99 mM. Se ha hipotetizado que el mecanismo antibacteriano del carvacrol es atribuido a su naturaleza lipofílica ($\log P=3.49$), la cual favorece su inclusión dentro de la membrana bacteriana causando una expansión, alteración de sistemas enzimáticos y pérdida de constituyentes celulares (Burt 2004). Tapia-Rodriguez *et al.* (2017) reportaron una CMI y CMB de 3.9 y 8.6 mM de carvacrol contra *P. aeruginosa*; mientras que Olasupo *et al.* (2003) reportó que el carvacrol a una concentración de 1.5 mM mostró mayor actividad antibacteriana contra *E. coli* que compuestos menos hidrofóbicos como el ácido cinámico (5.0 mM) y eugenol (2.5 mM). La efectividad antibacteriana del carvacrol con respecto a estos y otros compuestos fenólicos puede estar relacionado con una menor lipofilicidad ($\log P$ de 2.13 y 2.4, respectivamente) comparado con el carvacrol.

Por otro lado, se necesitó una concentración de carvacrol de 1.33 mM para inhibir el proceso de formación de biopelículas, mientras que la concentración mínima para erradicar biopelículas preformadas fue de 3.99 mM. Las diferencias observadas entre la CMI y CMIB es atribuida a que en el caso de la CMI, son necesarias concentraciones más altas para afectar el crecimiento bacteriano, mientras que para CMIB, es necesaria una dosis baja que no afecte el crecimiento bacteriano sino solo los mecanismos por los cuales se da el proceso de formación de biopelículas. Es por esto que la CMEB fue mayor que CMIB, ya que en este punto la biopelícula ya se encuentra formada y por lo tanto se necesita una mayor dosis de carvacrol para poder erradicarla.

La habilidad para formar biopelículas es un factor importante para la infección exitosa de cualquier bacteria, incluidas las especies de *Pectobacterium* (Jahn *et al.* 2011). Esto le permite a las bacterias resistir a condiciones adversas como lo son las condiciones ambientales o la presencia de compuestos antimicrobianos debido a la red de SPE sintetizadas que pueden retardarlos o inactivarlos. En este estudio, se observó que las concentraciones necesarias para eliminar las células planctónicas y de biopelículas fueron iguales, lo que podría indicar que la matriz de biopelículas de *P. carotovorum* es altamente porosa y permeable al carvacrol.

Joshi *et al.* (2016) reportaron que el carvacrol presenta un efecto inhibitorio contra *P. carotovorum* subsp. *brasilense* a concentraciones de 0.25 mM. Sin embargo, es importante señalar que estos autores no evaluaron las concentraciones mínimas necesarias para inhibir el desarrollo y para erradicar las biopelículas como se hizo en el presente estudio, sino solo su efecto sobre la biomasa. Hasta el momento, este es el primer reporte sobre las CMIB y CMEB del carvacrol contra *P. carotovorum*. El efecto del carvacrol para inhibir la formación de biopelículas podría posiblemente atribuirse a una interferencia del carvacrol con el proceso de adhesión de las bacterias a la superficie. Algunos estudios han demostrado que los flagelos, fimbrias tipo I y curli están implicados en los pasos de adhesión temprana y son controlados por mecanismos de comunicación intercelular (Guttenplan y Kearns 2013). De igual manera, las características superficiales de las bacterias y las superficies impactan en gran medida en el proceso de adhesión. En este sentido, es posible que el carvacrol actúe en estos puntos inhibiendo la adhesión inicial y, por lo tanto, el desarrollo de biopelículas.

6.1.2. Efecto del Carvacrol Sobre la Motilidad de *P. carotovorum*

Para que se lleve a cabo el proceso de adhesión a una superficie, las bacterias necesitan llegar a ésta ayudadas por estructuras extracelulares como los flagelos; siendo la motilidad flagelar un factor que ayuda a contrarrestar la repulsión hidrofóbica entre las células bacterianas y la superficie objetivo. Por esta razón se evaluó el efecto del carvacrol sobre la motilidad tipo swimming de *P. carotovorum* incubada a 28 °C por 24 h. En el Cuadro 3 se puede observar que el carvacrol a una concentración de 0.66 mM redujo significativamente ($p \leq 0.05$) la motilidad sin afectar la viabilidad

celular (Figura 7), mostrando una zona de motilidad de 6.5 mm en comparación con la de las bacterias no expuestas al carvacrol, las cuales se diseminaron por toda la superficie (54.7 mm).

Cuadro 3. Motilidad tipo swimming de *P. carotovorum* expuesta a carvacrol durante 24 h de incubación a 28 °C.

Tratamiento	Zona de motilidad (mm)
Control	54.7 ± 2.30
Carvacrol (0.66 mM)	6.5 ± 0.40

Los valores son expresados como medias ± desviación estándar (DE), n=3. (p≤ 0.05).

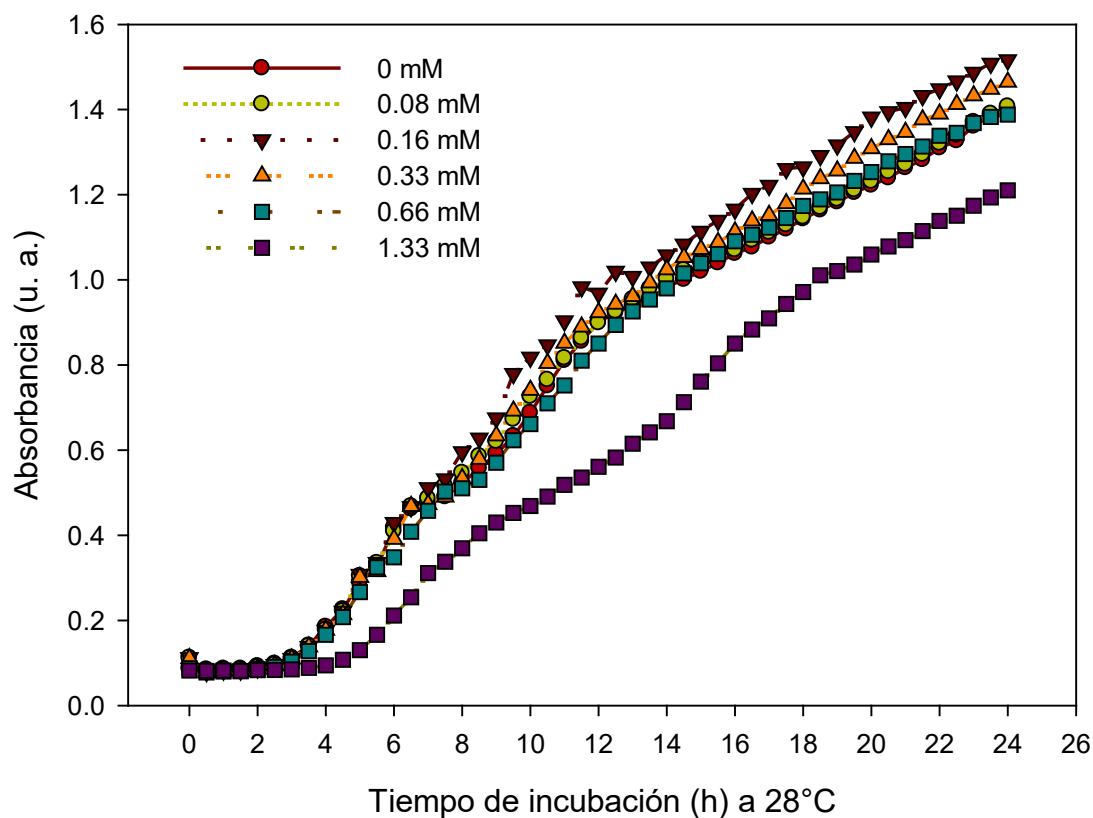


Figura 7. Curvas de crecimiento de *P. carotovorum* expuesta a concentraciones sub-inhedoras de carvacrol. Los valores son expresados como medias de n= 3.

Se ha reportado que la motilidad es un factor de virulencia importante en muchas bacterias fitopatógenas, incluyendo *Pectobacterium* y se ha correlacionado con la capacidad del microorganismo para colonizar las superficies del huésped (Hossain *et al.* 2005, Duan *et al.* 2013). Especialmente, la motilidad mediada por flagelos se ha asociado con la formación de biopelículas favoreciendo la adhesión de *P. aeruginosa* y *E. coli* (Guttenplan y Kearns 2013), y desempeña un papel clave en la virulencia. Por lo tanto, una interrupción en la motilidad podría inhibir el proceso de formación de biopelículas. Es importante destacar el impacto puede tener la reducción de la motilidad en la contaminación cruzada ya que para que una bacteria pueda migrar de una superficie a otra, esta debe superar las fuerzas de repulsión e interactuar con la fase sólida o la película acondicionadora de la otra superficie.

Dependiendo de la fuerza de los enlaces que puedan formarse, la motilidad es a menudo crucial para que se lleve a cabo la unión. En las primeras etapas del proceso de adhesión, la interacción entre la bacteria y la superficie se da por la combinación de enlaces químicos débiles, interacciones dipolo e interacciones hidrófobas que se dan en parte por los componentes de la envoltura bacteriana (Lejeune 2003). Por lo tanto, la ausencia de motilidad en *P. carotovorum* al ser expuesta a carvacrol puede evitar que esta migre a otra superficie y por lo tanto, reducir las pérdidas asociadas a la contaminación de otras superficies tanto bióticas como abióticas. Similar a este estudio, Inamuco *et al.* (2012) reportaron que la motilidad de *S. Typhimurium* se redujo ligeramente con carvacrol a 0.4 mM y se eliminó completamente a 1 mM. Burt *et al.* (2007) reportaron una completa inhibición de la motilidad de *E. coli* expuesta a 1 mM de carvacrol. En estos estudios, los autores observaron que la pérdida de motilidad se atribuyó a una inhibición de la síntesis de flagelos, la cual está regulada por el QS dependiente de AHL en *Pectobacterium* spp. (Sivaranjani *et al.* 2016). En este sentido, es posible que el efecto del carvacrol sobre la motilidad tipo swimming en *P. carotovorum* pueda atribuirse a una interrupción de este proceso.

6.1.3. Carga Superficial Bacteriana de *P. carotovorum* Expuesta a Carvacrol

La adhesión bacteriana puede verse influida por cambios en la superficie de las bacterias y el sustrato, así como en el entorno donde esto ocurre. Por esta razón, se evaluó el efecto de carvacrol

sobre la carga superficial de *P. carotovorum*, midiendo el potencial zeta. Se observó que el carvacrol disminuyó ($p \leq 0.05$) el potencial zeta negativo de *P. carotovorum* en comparación con las bacterias no tratadas (Cuadro 4). Muchas bacterias Gram-negativas presentan carga superficial negativa; sin embargo, esto depende de la especie, serotipo o cepa, y puede cambiar con la variación en las condiciones de crecimiento, el estado fisiológico de las células y la composición de los medios de suspensión (Li y McLandsborough 1999). Una carga negativa más fuerte en la superficie celular conduce a una repulsión electrostática pronunciada entre las bacterias y las superficies y, por consiguiente, podría inhibir el paso crucial de la adhesión.

Cuadro 4. Carga superficial de *P. carotovorum* expuesta a carvacrol durante 24 h de incubación a 28 °C.

Tratamiento	Potencial zeta (mV)
Control	-9.85 ± 0.81
Carvacrol (0.66 mM)	-12.00 ± 1.10

Los valores son expresados como medias \pm DE, n= 3. ($p \leq 0.05$).

6.1.4. Energía Superficial y Potencial de Adhesión de *P. carotovorum* Expuesta a Carvacrol

La Figura 8 (A y B) muestra el efecto del carvacrol sobre la energía superficial de *P. carotovorum* determinado espectrofotométricamente. Se puede observar que el carvacrol redujo ($p \leq 0.05$) la energía superficial de *P. carotovorum* de 38.91 a 35.79 mJ/m², considerando que la DO máxima ocurre cuando la energía superficial de la bacteria es igual a la tensión superficial del líquido donde están suspendidos (Vazquez-Armenta *et al.* 2018). La energía superficial se puede considerar como una medida de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, donde una energía superficial más baja indica una mayor hidrofobicidad (Briandet *et al.* 1999). En este sentido, es posible que el carvacrol causara un cambio en las propiedades fisicoquímicas de la superficie de *P. carotovorum* haciéndola más hidrofóbica.

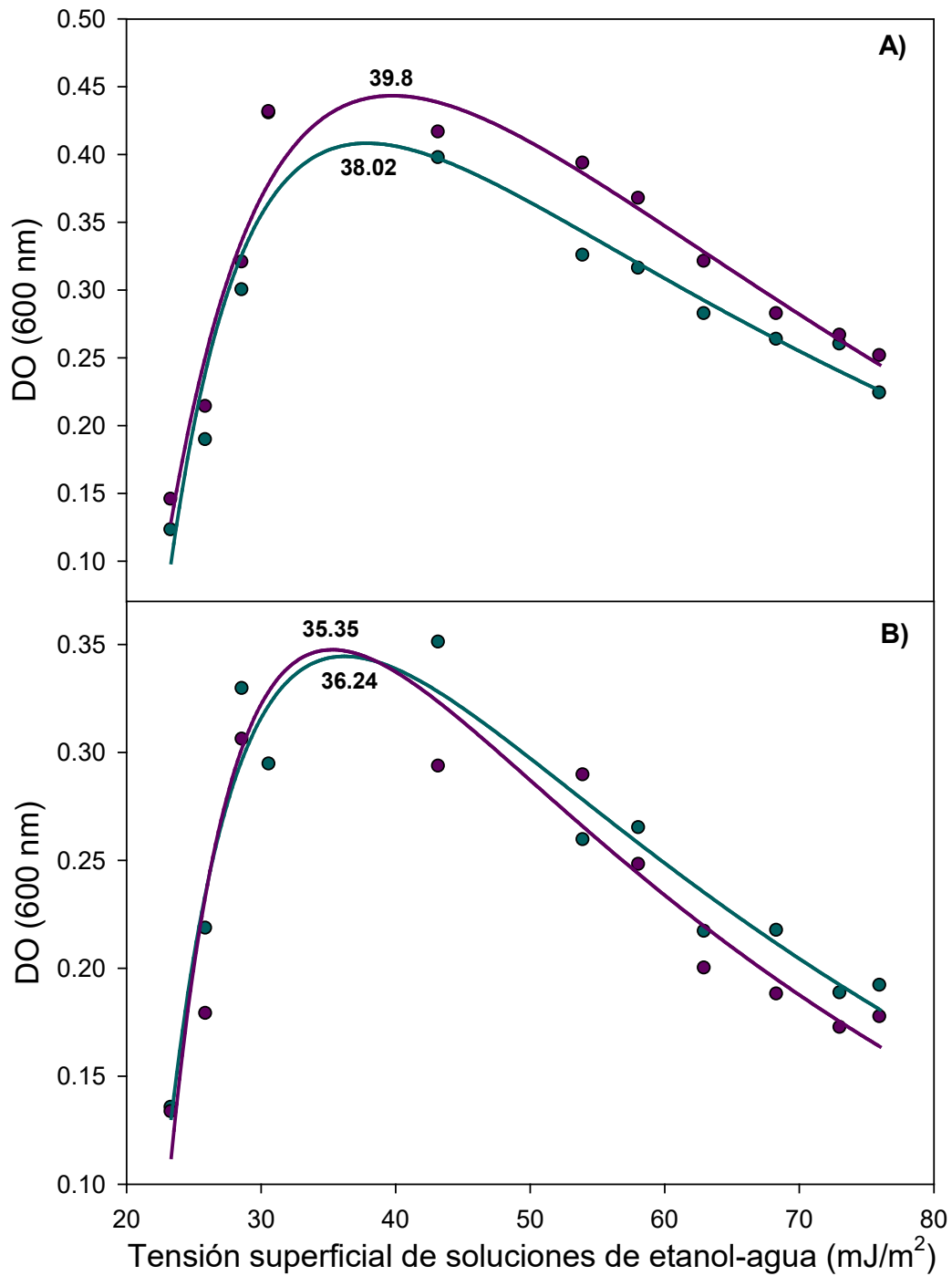


Figura 8. Energía superficial de *P. carotovorum* control (A) y expuesta a carvacrol (0.66 mM) (B). Nota: los círculos azules y morados representan los valores del primer y segundo experimento.

Estos resultados son similares a los reportados por Vazquez-Armenta *et al.* (2018), quienes encontraron una disminución de los valores de energía superficial de *Listeria monocytogenes* de 37.49-31.32 y 32-30 mJ/m² después de su exposición a extractos de tallo de uva Red Globe y Carignan (ricos en compuestos fenólicos), respectivamente. La energía superficial de *P. carotovorum* fue inferior a la reportada para *S. Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *E. coli* (49.5, 59.3, 64.5 y 65.1 mJ/m², respectivamente); considerados hidrofílicos (Zhang *et al.* 2015). La adhesión de microorganismos a las superficies es un proceso muy complejo, con muchas variables que afectan el resultado, como las propiedades superficiales, no solo de las bacterias, sino también del sustrato y el medio. En general, la adhesión se producirá más fácilmente en superficies más ásperas, más hidrófobas o recubiertas por películas de acondicionamiento.

Por otro lado, el Cuadro 5 muestra el efecto del carvacrol en el potencial de adhesión (ΔG_{adh}) entre *P. carotovorum* y la superficie de polipropileno. Se encontró un ΔG_{adh} de -15.69 ± 0.63 entre *P. carotovorum* y el polipropileno, la cual se redujo significativamente ($p \leq 0.05$) por la exposición a 0.66 mM de carvacrol (-17.19 ± 0.29). De acuerdo con el enfoque termodinámico en el que las interacciones fisicoquímicas son consideradas, la adherencia es favorable solo cuando la energía es negativa. Debido a que la fase inicial del proceso de adhesión se rige por estas interacciones, el valor negativo observado entre *P. carotovorum* y la superficie de polipropileno indica que la adherencia es favorable entre ambos sustratos (Bayoudh *et al.* 2006).

Cuadro 5. Potencial de adhesión (ΔG_{adh}) entre *P. carotovorum* expuesta a carvacrol y la superficie de polipropileno.

Tratamiento	ΔG_{adh} (mJ/m ²)
Control	-15.69 ± 0.63
Carvacrol (0.66 mM)	-17.19 ± 0.29

Los valores son expresados como medias \pm DE, n= 3. ($p \leq 0.05$).

Se observó que la presencia de carvacrol disminuyó el potencial de adhesión, haciéndolo más negativo; en este sentido, el carvacrol posiblemente tuvo un efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de las bacterias que hicieron la adherencia termodinámicamente más favorable

(Vazquez-Armenta *et al.* 2018). Sin embargo, los recuentos de *P. carotovorum* en el ensayo de formación de biopelículas se redujeron significativamente en presencia de carvacrol. Se ha reportado que la adhesión bacteriana es un proceso complejo afectado por múltiples factores como las propiedades fisicoquímicas de las células bacterianas, su energía libre superficial, potencial zeta, producción de SPE y presencia de pilis y flagelos (Tuson y Weibel 2013). Estos y otros parámetros afectan el inicio y progresión de la adhesión bacteriana a superficies sólidas. Sin embargo, es importante mencionar que el carvacrol pudo haber interferido con otros mecanismos moleculares como la comunicación intercelular que regula algunos de estos procesos.

Debido a que el ΔG_{adh} solo indica la probabilidad termodinámica de la adhesión, Zhang *et al.* (2015) propusieron que la adhesión bacteriana puede ser cuantitativamente predecida utilizando el valor absoluto de la diferencia entre la energía superficial de las bacterias y la superficie de adhesión ($|\gamma^{bv} - \gamma^{sv}|$). En este sentido, en base a lo reportado por Vazquez-Armenta *et al.* (2018) las células adheridas se correlacionaron negativamente con el incremento en la diferencia de energía superficial entre las bacterias y las superficies. Por lo tanto, es posible que el carvacrol hiciera más grande la diferencia de energía superficial entre las células de *P. carotovorum* y las superficies de polipropileno, causando una reducción en la adhesión bacteriana.

6.1.5. Efecto del Carvacrol Sobre la Formación de Biopelículas y Secreción de SPE de *P. carotovorum*

La Figura 9 muestra el proceso de formación de biopelículas de *P. carotovorum* durante 48 h a 28 °C. Se puede observar que al incrementar el tiempo de incubación, la densidad celular de *P. carotovorum* aumentó, mostrando 4.90 log UFC/cm² de células viables adheridas a las 0.5 h; las cuales aumentaron a 5.84 log UFC/cm² a las 6 h de incubación. A las 12 h, la población de las biopelículas fue de 6.36 logs, alcanzando un densidad celular máxima de 6.97 log UFC/cm² a las 48 h, sin cambios significativos ($p \geq 0.05$) con las 24 h (6.89 log UFC/cm²) de incubación a 28 °C. Sin embargo, en presencia de carvacrol (0.66 mM) se logró una reducción significativa ($p \leq 0.05$) (3.02 log UFC/cm²) en las etapas tempranas del desarrollo de la biopelícula (0.5 h).

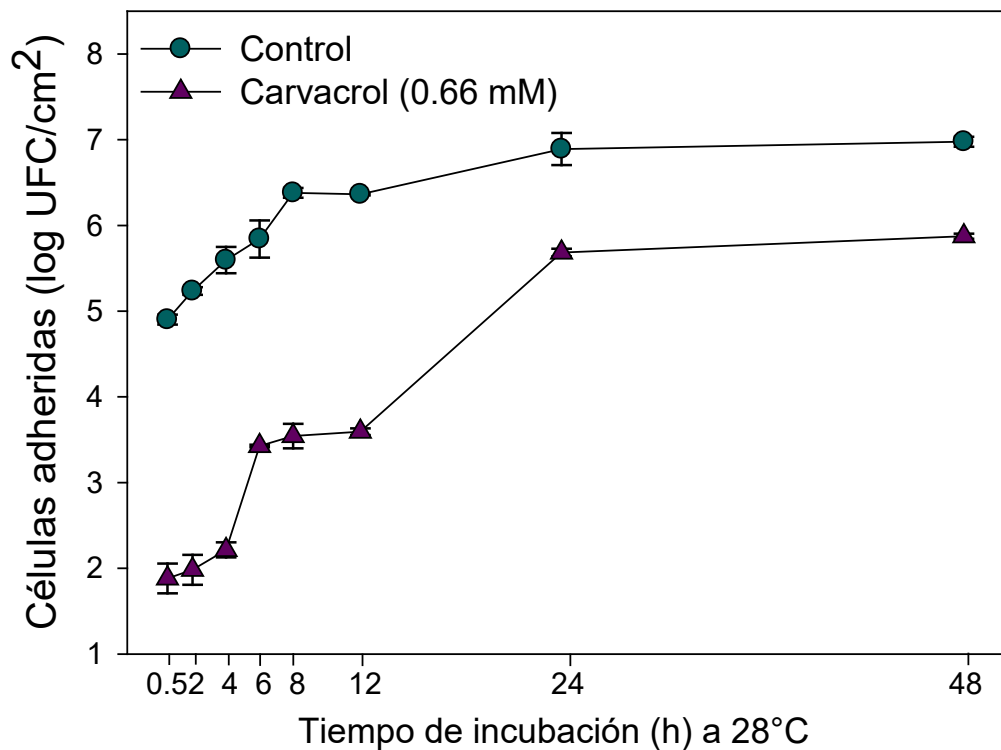


Figura 9. Efecto del carvacrol en la formación de biopelículas de *P. carotovorum* en cupones de polipropileno incubados a 28 °C por 48 h. Los valores son expresados como medias \pm DE, n=3. ($p \leq 0.05$).

Esta inhibición se mantuvo durante todo el desarrollo de la biopelícula, mostrando a las 6 h 3.42 log UFC/cm² (equivalente a una reducción de 2.42 log UFC/cm² en comparación con las bacterias no tratadas). Al final del período de incubación, *P. carotovorum* expuesta a carvacrol mostró una densidad celular máxima de 5.87 UFC/cm². En base a los resultados antes mencionados, es posible que la reducción de la adhesión bacteriana se atribuya a la disminución de la motilidad como se observó anteriormente, ya que esta juega un papel importante en la colonización microbiana y propagación de las bacterias a través de la superficie, así como en la formación de biopelículas (Harshey 2003). Esto fue corroborado por el análisis de microscopía donde se pudo observar una reducción en las células adheridas a medida que aumentó el tiempo de incubación comparado con el control (Figura 10). En este sentido, la exposición continua de *P. carotovorum* a una concentración no biocida de carvacrol interrumpió el desarrollo normal de la biopelícula.

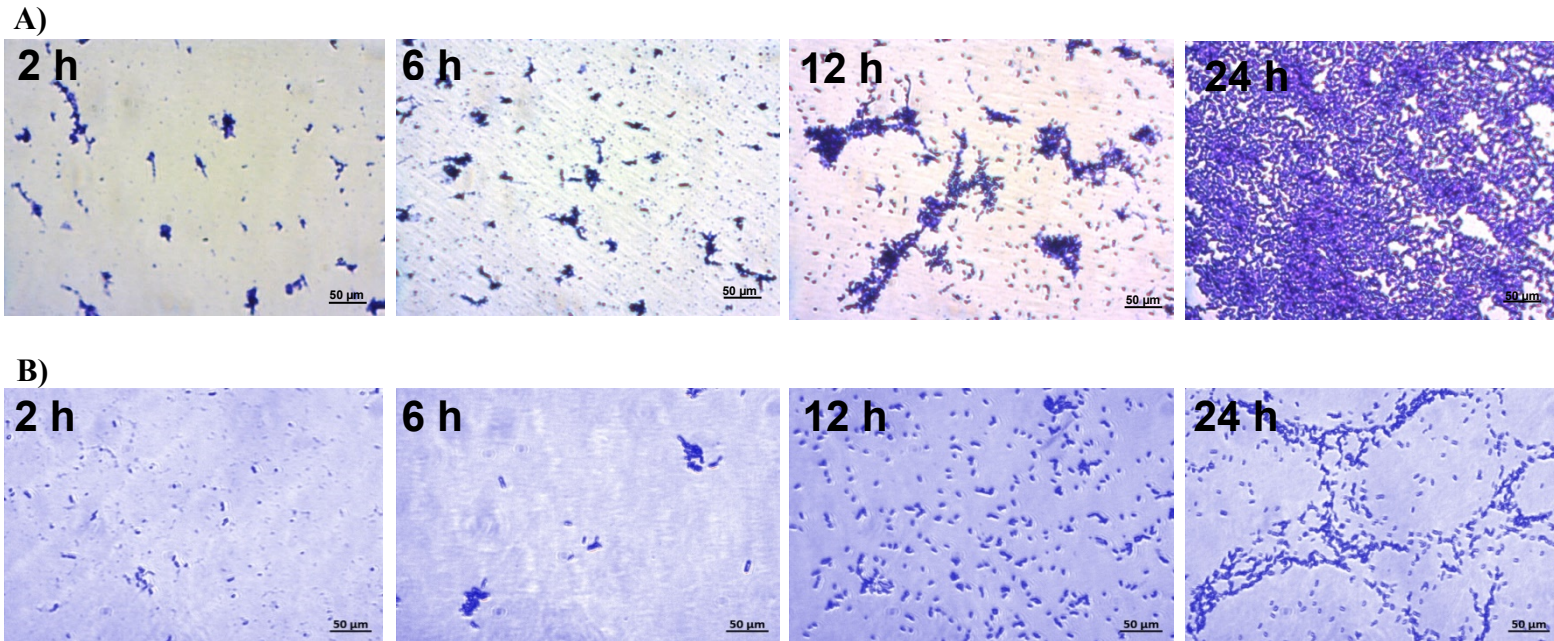


Figura 10. Imágenes de microscopía de biopelículas de *P. carotovorum* control (A) y expuestas a carvacrol (0.66 mM) (B), incubadas a 28 °C por 24 h. Las biopelículas fueron teñidas con cristal violeta y la morfología se observó a 600x de magnitud en un microscopio Axio-Vert (Carl Zeiss).

Aunque existen estudios sobre el efecto de compuestos naturales sobre la formación de biopelículas de patógenos de plantas como *P. carotovorum*, estos se han enfocado en medir la formación de biopelículas como agregados o biomasa, dejando de lado que la medición de la biomasa (cristal violeta) puede brindar información inespecífica sobre una gran diversidad de componentes que conforman las biopelículas. Es necesario hacer un análisis más profundo, contemplando este *statu quo* precisamente como un sistema de múltiples componentes en el que cada uno de estos influye grandemente en las características de la virulencia. Por lo tanto, se caracterizó la composición de SPE durante el proceso de formación de biopelículas de *P. carotovorum* en presencia de carvacrol. Se encontró que los polisacáridos son los principales constituyentes de la matriz de las biopelículas de *P. carotovorum*, los cuales incrementan durante el tiempo de incubación (Figura 11).

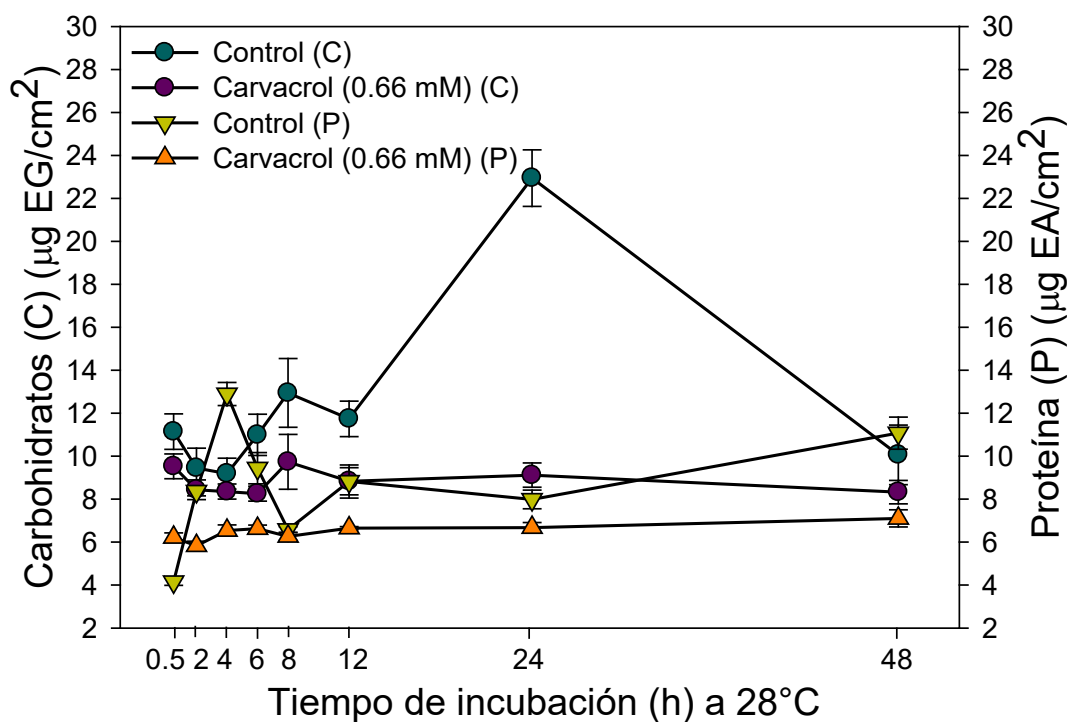


Figura 11. Efecto del carvacrol en la síntesis de SPE durante la formación de biopelículas de *P. carotovorum* en cupones de polipropileno a 28 °C por 48 h. Los valores son expresados como medias \pm DE, n=3.

Se observó que a las 0.5 h el contenido de polisacáridos fue de 9.45 EG/cm², el cual disminuyó con la presencia de carvacrol hasta 8.43 EG/cm². Después de 2 h, éste permaneció constante hasta las 4 h ($p \geq 0.05$) y luego, aumentó ($p \leq 0.05$) a 11.73 y 8.83 EG/cm² a las 12 h en *P. carotovorum* no tratado y tratado con carvacrol, respectivamente. A las 24 h, el carvacrol provocó una reducción ($p \leq 0.05$) en la síntesis de polisacáridos de 22.94 a 9.11 EG/cm². Con respecto al contenido de proteínas, la matriz de las biopelículas no tratadas mostró valores entre 4.15 y 11.07 EA/cm² a lo largo del periodo de incubación; mientras que el tratamiento con carvacrol causó una reducción significativa, presentando valores entre 6.21 y 7.10 EA/cm², los cuales permanecieron constantes hasta las 48 h. De los resultados obtenidos, se observó que el carvacrol (0.66 mM) inhibió la motilidad, síntesis de SPE y desarrollo de la biopelícula sin inhibir el crecimiento de las células planctónicas. Por lo tanto, es posible que la reducción de la formación de biopelículas pueda atribuirse a una inhibición de la síntesis de SPE, debido a una interferencia del carvacrol con el QS y no por la inhibición del crecimiento de *P. carotovorum*. Hay estudios que han relacionado la capacidad de algunos compuestos naturales para inhibir biopelículas con una interferencia en los mecanismos del QS (Vattem *et al.* 2007).

Estudios previos con *P. aeruginosa* han demostrado que la síntesis de SPE es inducida por la unión de bacterias a la superficie (Davies *et al.* 1993, Prigent-Combaret *et al.* 1999) y que el QS gobierna este proceso en muchas bacterias (Koutsoudis *et al.* 2006, Garrett *et al.* 2008). Como resultado de la alta densidad celular, las bacterias tienden a comunicarse con células vecinas a través de la síntesis y recepción de AHL mediante las proteínas del QS ExpI/ExpR, cambiando sus patrones de expresión génica. Se ha reportado que el QS conduce a una activación de genes de síntesis de polisacáridos, particularmente, los sistemas de polimerización de azúcares tales como glucosiltransferasas y sacarosa sintasas (Sakuragi y Kolter 2007). En este sentido, como se observó anteriormente, el carvacrol causó una reducción en la síntesis de polisacáridos durante el desarrollo de la biopelícula, lo cual puede atribuirse a una afectación del QS o a la inactivación directa de glucosiltransferasas.

De manera similar, Joshi *et al.* (2016) observaron una reducción en la formación de biopelículas de *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* al ser expuesta a carvacrol (0.25 mM) e hipotetizaron que éste interfirió con el QS; sin embargo, estos autores no evaluaron el efecto del carvacrol en la síntesis de SPE y su relación con el desarrollo de la biopelícula. Por otro lado, diversos estudios han mostrado la eficacia del carvacrol (0.7 mM) para reducir biopelículas de *Salmonella* Saintpaul

formadas sobre superficies de acero inoxidable, logrando reducciones de 2 log UFC/cm² (Uchida *et al.* 2015). Tapia-Rodriguez *et al.* (2017) reportó que el carvacrol (0.9-7.9 mM) no solo afecta la formación de biopelículas, sino que también inhibe otros factores de virulencia tales como la síntesis de piocianina y violaceína en *P. aeruginosa* y *C. violaceum*, respectivamente. Es importante mencionar que además de la bien documentada actividad antimicrobiana del carvacrol, éste también ha sido designado como un inhibidor del QS. Este es el primer estudio sobre la composición de SPE de las biopelículas de *P. carotovorum*.

Estudios previos han reportado que los polisacáridos son los constituyentes principales de la matriz de biopelículas de algunos patógenos vegetales. Koczan *et al.* (2009) reportaron que la matriz de las biopelículas de *Pectobacterium amylovorum* (*Erwinia amylovora*) está compuesta por amilovorán y leván, los cuales son considerados factores de virulencia que contribuyen a su patogenicidad y resistencia. Por otro lado, las biopelículas de *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*) y *Agrobacterium tumefaciens* están compuestas principalmente por celulosa (Danhorn y Fuqua 2007, Jahn *et al.* 2011). Las diferencias en la composición de SPE incluso entre especies del mismo género destaca la importancia de la caracterización de la composición y formación de biopelículas y su influencia en la patogenicidad y resistencia. En este sentido, sería interesante en estudios futuros el determinar la composición y tipo de polisacáridos presentes en la matriz de biopelículas de *P. carotovorum* debido al papel que estos juegan en la resistencia contra agentes antimicrobianos.

Se espera que los agentes antimicrobianos se puedan difundir a través de la matriz de SPE e inactiven las bacterias dentro de la biopelícula. Sin embargo, las SPE retardan la difusión de estos compuestos, ya sea por reaccionar químicamente con ellos; siendo los polisacáridos los mayormente implicados en la resistencia contra antimicrobianos en comparación con las proteínas. Sin embargo, en el presente estudio, la matriz de SPE no interfirió con el carvacrol ya que la CMEB fue igual a la CMB. Estos hallazgos son motivo de preocupación ya que los materiales plásticos se usan frecuentemente en los campos de cultivo para el almacenamiento y transporte de frutas y vegetales. Se ha demostrado que algunas bacterias pueden adherirse más a las superficies hidrofóbicas como plásticos que a superficies hidrofílicas como el vidrio y acero inoxidable (Tondo *et al.* 2010). Esto podría explicar la habilidad de *P. carotovorum* para producir biopelículas en superficies de plástico, considerando que la adhesión es el primer paso en el proceso de formación de biopelículas (Steenackers *et al.* 2012).

6.2. Etapa 2: Efecto del Carvacrol Sobre la Producción de Exoenzimas de *P. carotovorum*

6.2.1. Inhibición de la Actividad de Exoenzimas de *P. carotovorum* Expuesta a Carvacrol

El proceso de infección de *P. carotovorum* se caracteriza por la síntesis de un arsenal de exoenzimas con la finalidad de degradar tejido vegetal y obtener nutrientes para su desarrollo. Es por esto que se determinaron los niveles de exoenzimas secretadas por *P. carotovorum* al ser expuesta a 0.66 mM de carvacrol durante 24 h, midiendo la actividad de las mismas en los sobrenadantes libres de células. Se pudo observar que todas las actividades disminuyeron de manera significativa ($p \leq 0.05$) al ser expuestas a carvacrol. Particularmente, la actividad poligalacturonasa (Figura 12A) disminuyó de 17.65 a 10.81 U/mg de proteína, mientras que la actividad pectato liasa (Figura 12B) disminuyó de 30.81 a 15.34 U/mg de proteína, con respecto al control. La reducción en la síntesis de estas exoenzimas determina el desarrollo del proceso de infección en *P. carotovorum*, ya que estudios previos han mostrado que cepas mutantes que carecen de su habilidad para sintetizar o secretar exoenzimas muestran un fenotipo avirulento (Laasik *et al.* 2005).

Se ha reportado que la síntesis de exoenzimas en *Pectobacterium* está regulada por el QS; esto ha sido evidenciado en estudios con mutantes, donde al eliminar el gen que codifica para la proteína del QS ExpI, se reduce la síntesis de las mismas (Lee *et al.* 2013). La forma en la cual el QS este proceso será abordado en la sección 6.3.1. Por lo tanto, el efecto del carvacrol en la disminución de la actividad de las exoenzimas puede estar relacionado con una menor abundancia de las mismas causada por una reducción en su síntesis por la afectación del QS. Sin embargo, es importante mencionar que es posible que el carvacrol también haya tenido un efecto pos-traducciona, es decir, afectado la actividad de las exoenzimas ya sintetizadas. En este sentido, se realizó un análisis de modelaje molecular con la finalidad de determinar si existen interacciones entre el carvacrol y los aminoácidos catalíticos de las enzimas poligalacturonasa y pectato liasa de *P. carotovorum* y poder así, atribuir las respuestas observadas a un efecto anti-QS.

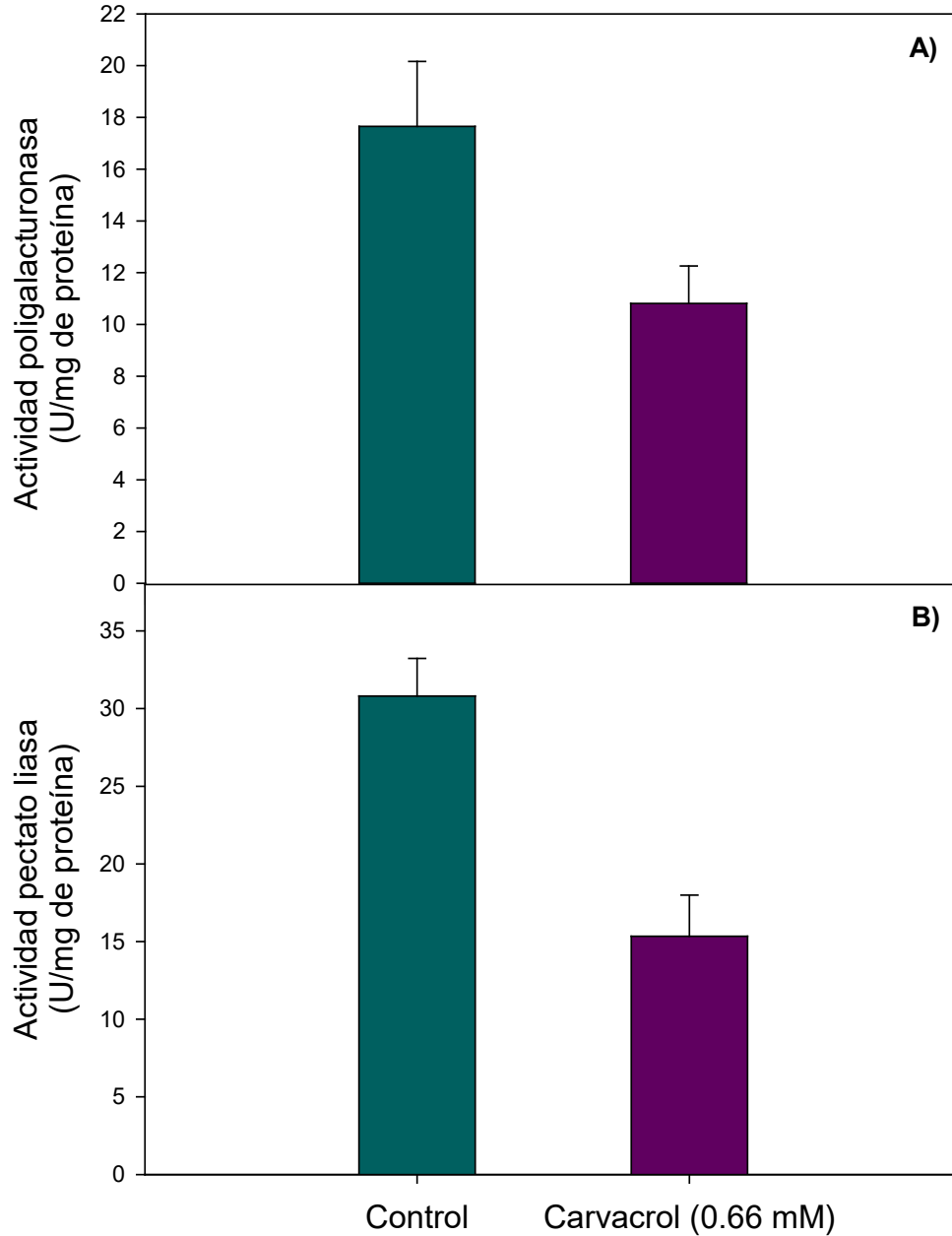


Figura 12. Efecto del carvacrol sobre la actividad poligalacturonasa (A) y pectato liasa (B) en sobrenadantes de cultivos de *P. carotovorum* durante 24 h a 28 °C. Los valores son expresados como medias \pm DE, n=3. $p \leq 0.05$.

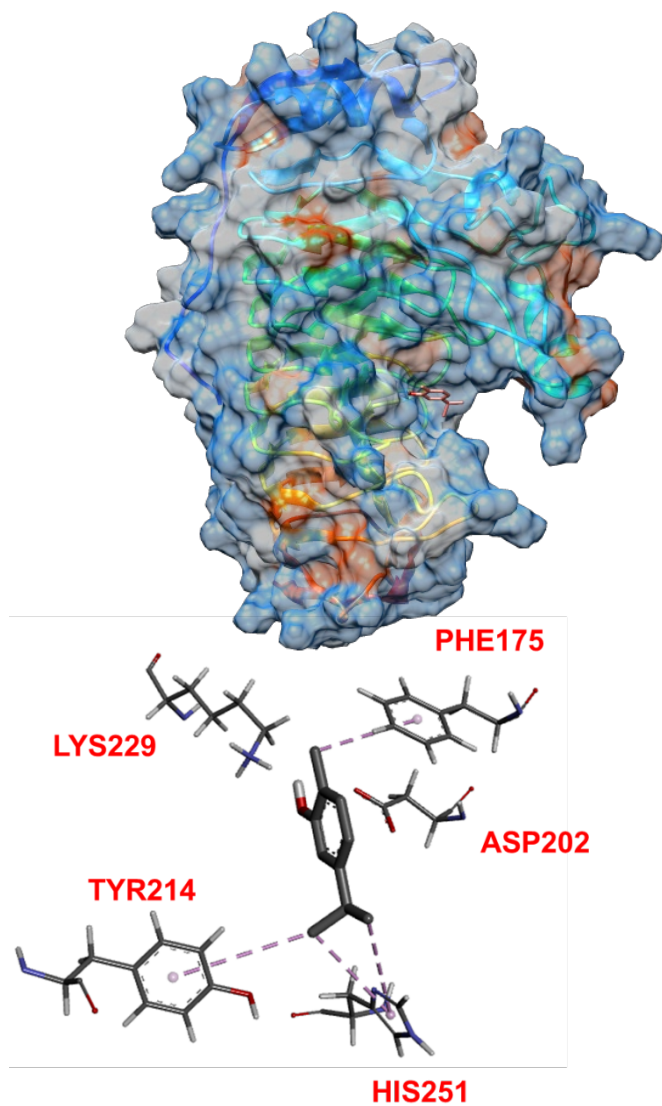
En la Figura 13A se muestra el modelaje molecular del carvacrol con la poligalacturonasa en la mejor pose (-4.5 kcal/mol), la cual se orienta a una cavidad donde se encuentra el sitio activo de la enzima. En este sitio, se encuentran Asp202 y Asp223, residuos conservados implicados en la actividad catalítica de la enzima, los cuales fungen como donadores de base y protón en el mecanismo de inversión para la rotura de los enlaces glucosídicos del ácido poligalacturónico (Creze *et al.* 2008). En este sentido, cualquier interacción en este sitio podría afectar la actividad catalítica de la enzima. Sin embargo, el carvacrol no mostró interacción de ningún tipo con Asp202. Por otra parte, para el caso de la enzima pectato liasa, el aminoácido Arg218 y Asp131 son los aminoácidos implicados en el reconocimiento y abstracción de protones del ácido poligalacturónico para llevar a cabo la escisión del enlace glucosídico por β -eliminación (Herron *et al.* 2000). Sin embargo, para esta proteína el carvacrol mostró interacciones lejos de este sitio (Figura 13B). Por lo tanto, basándonos en esta evidencia, es posible que el carvacrol no haya afectado la actividad enzimática sino la síntesis de las mismas.

Estudios similares han reportado el efecto del carvacrol sobre la actividad de exoenzimas de *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, medida semi-cuantitativamente como halos de actividad (%) en placa. Se pudo observar que el carvacrol a 0.25 mM reduce un 60 y 100% la actividad pectato liasa y poligalacturonasa, respectivamente. Aceites esenciales ricos en carvacrol como el de *Satureja khuzistanica* (49.4%) también fue efectivo para reducir la secreción de estas exoenzimas en un 60-80% en dos cepas de *P. carotovorum*, la JX029052 y la ATCC 15713 (usada en este estudio) (Hajian-Maleki *et al.* 2019).

6.2.2. Efecto del Carvacrol Sobre la Maceración de Tejidos de Papa causada por *P. carotovorum*

En la Figura 14 se puede observar el efecto del carvacrol sobre la producción de exoenzimas de *P. carotovorum* en tejidos de papa. Los resultados indican que el carvacrol, redujo de manera significativa la patogenicidad de la bacteria, reflejado como un menor daño al tejido vegetal (Figura 14 B, C). Conforme aumenta el tiempo de incubación, se observa un mayor daño en tejido, presentándose el inicio de este a partir de las 48 h y una maceración completa del tejido control a las 72 h de incubación a 28 °C (Figura 15A).

A)



B)

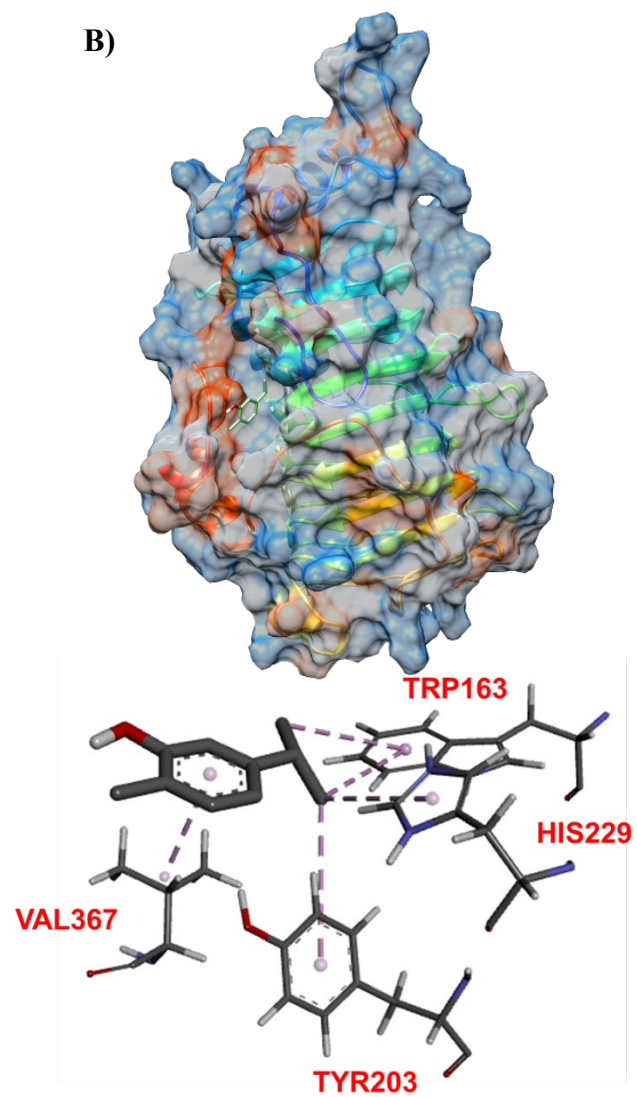


Figura 13. Análisis de modelaje molecular del carvacrol con las proteínas poligalacturonasa (A) y pectato liasa (B) de *P. carotovorum*. Se muestran interacciones entre el carvacrol y aminoácidos no catalíticos de ambas proteínas.

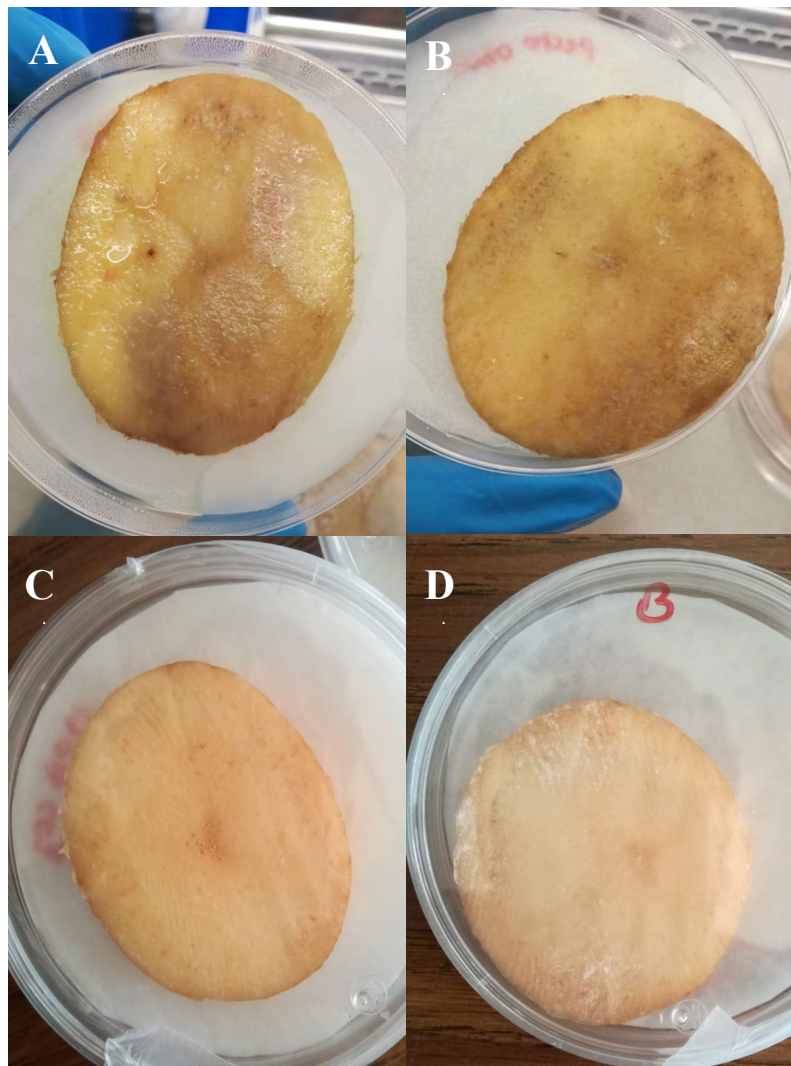


Figura 14. Efecto del carvacrol sobre el daño a tejido de papa causado por *P. carotovorum* durante 48 h a 28 °C. A= control (no tratado), B= carvacrol (0.66 mM, vapor), C= carvacrol (0.66 mM, líquido) y D= testigo (no inoculado); n=3.

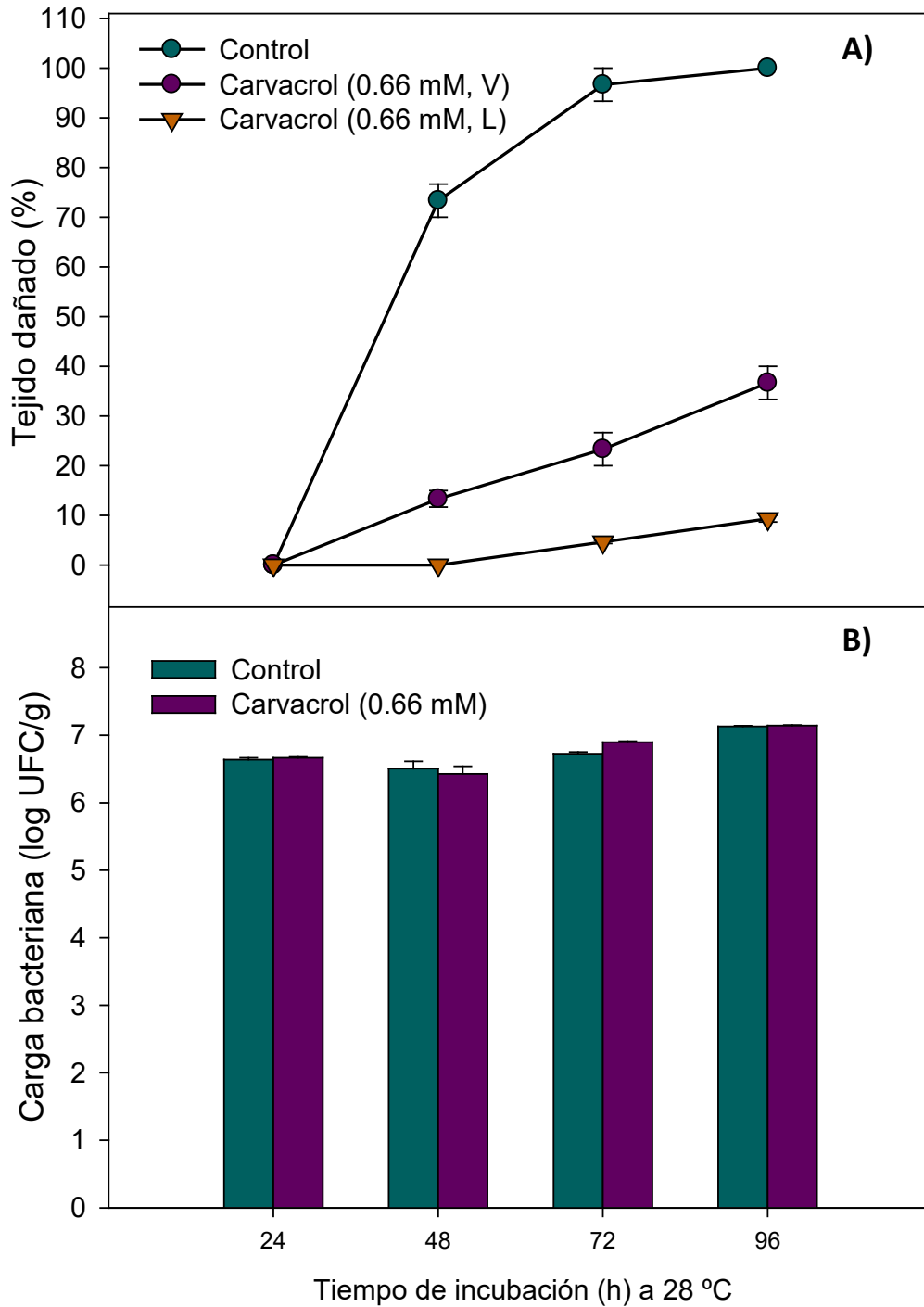


Figura 15. Efecto del carvacrol sobre el daño a tejido de papa causado por *P. carotovorum* durante 96 h a 28 °C (A) ($p \leq 0.05$). El tratamiento no afectó la carga bacteriana durante el ensayo (B) ($p \geq 0.05$). Los valores son expresados como medias \pm DE, $n=3$.

Como se mencionó anteriormente, este microorganismo utiliza como principal factor de virulencia las exoenzimas para degradar la pectina de la pared celular de plantas con el fin de obtener nutrientes para su supervivencia y su producción se inicia hasta que la densidad poblacional es elevada. Esto concuerda con el presente estudio y lo reportado por Smadja *et al.* (2004), quienes observaron el inicio de la progresión de la enfermedad causada por *P. atrosepticum* a partir de las 48 h de incubación. Con la finalidad de poder atribuir este efecto a una interrupción de la síntesis de exoenzimas y no a una disminución de la población bacteriana, se hizo un conteo de la misma a los diferentes tiempos de incubación y se pudo observar que ambos tratamientos presentaron la misma carga bacteriana, la cual osciló entre 6.7-7.2 log UFC/g (Figura 15B). Esto concuerda con evidencia previa que menciona que la carga bacteriana en tejido usualmente no excede un nivel crítico de aproximadamente 10^7 células/g, al cual la maceración del tejido ocurre (Pérombelon 2002).

Estudios previos han reportado la capacidad de este compuesto de reducir la incidencia de la enfermedad causada por *P. carotovorum*; tal es el caso de Joshi *et al.* (2016) quienes reportaron que el carvacrol (3 y 1.5 mM) redujo un 35% y 20% el daño a tejido de papa causado por *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *brasilense*, respectivamente. Compuestos fenólicos estructuralmente similares al carvacrol como el ácido cinámico (0.74 mg/mL) y el ácido salicílico (0.42 mg/mL) también inhibieron completamente la maceración de tejido de papa y flor alcatraz causada por estas bacterias (Joshi *et al.* 2015). Como se mencionó anteriormente, tanto *P. carotovorum* como otras especies de *Pectobacterium* provocan la maceración de tejidos vegetales debido a su capacidad para sintetizar exoenzimas como pectin liasas, pectin metil esterases y poligalacturonasas, las cuales son reguladas por el QS. Es por esto que es de vital importancia analizar el posible efecto que el carvacrol esté teniendo en el proceso de comunicación bacteriana con la finalidad de tener un acercamiento al posible mecanismo de acción anti-QS.

6.3. Etapa 3: Efecto del Carvacrol Sobre el QS de *P. carotovorum*

6.3.1. Producción de AHLs por *P. carotovorum* expuesto a carvacrol

Con la finalidad de tener un acercamiento sobre el posible mecanismo de acción anti-QS del carvacrol contra *P. carotovorum*, se determinó el efecto del compuesto sobre la síntesis de las moléculas señal 3-oxo-C6-AHL y 3-oxo-C8-AHL, encargadas de regular la síntesis de factores de virulencia en *P. carotovorum*. Se puede observar en la Figura 16 que el carvacrol redujo ($p \leq 0.05$) la síntesis de 3-oxo-C6-AHL en cultivos de *P. carotovorum* incubados a 28 °C por 24 h. Se pudo observar una producción de 3-oxo-C6-AHL de 4.14 y 3.77 mM en los cultivos control y tratados con carvacrol, respectivamente; mientras que 3-oxo-C8-AHL no fue detectada en ninguno de los tratamientos bajo las condiciones experimentales utilizadas. Crépin *et al.* (2012) reportaron que diferentes cepas de *P. carotovorum* (CFBP 2046, 98.1 y RNS 08.42.1A) producen mayoritariamente la 3-oxo-C6-AHL (>90%) con respecto a la 3-oxo-C8-AHL (<4%). De manera similar, Noel *et al.* (2010) reportaron la presencia de 3-oxo-C6-AHL en cultivos de *P. carotovorum* SR38, mientras que 3-oxo-C8-AHL no fue detectada. Previamente se reportó que el carvacrol redujo la síntesis de AHL de *P. carotovorum* subsp. *brasilense* y *P. aroidearum* a una concentración de 0.25 mM (Joshi *et al.* 2016).

Sin embargo, no se llevó a cabo una cuantificación directa de las moléculas señal producidas por el microorganismo sino una medición indirecta mediante la luminiscencia generada por la bacteria biosensora *Escherichia coli* pSB401 en presencia de AHL exógenas. Si bien, el uso de cepas biosensoras da información relevante acerca de la reducción en la síntesis de moléculas señal, es necesario complementar estos estudios con análisis que permitan una cuantificación directa de la misma como es el caso del presente estudio el cual no solo nos permitió cuantificar, sino detectar que los efectos solo eran atribuidos a la presencia de 3-oxo-C6-AHL. De manera similar, Tapia-Rodriguez *et al.* (2019) reportaron un 60% de reducción en las AHL sintetizadas por *Pseudomonas aeruginosa* expuesta a 1.9 mM de carvacrol, lo cual se vio reflejado directamente en una reducción de los factores de virulencia regulados por estas moléculas.

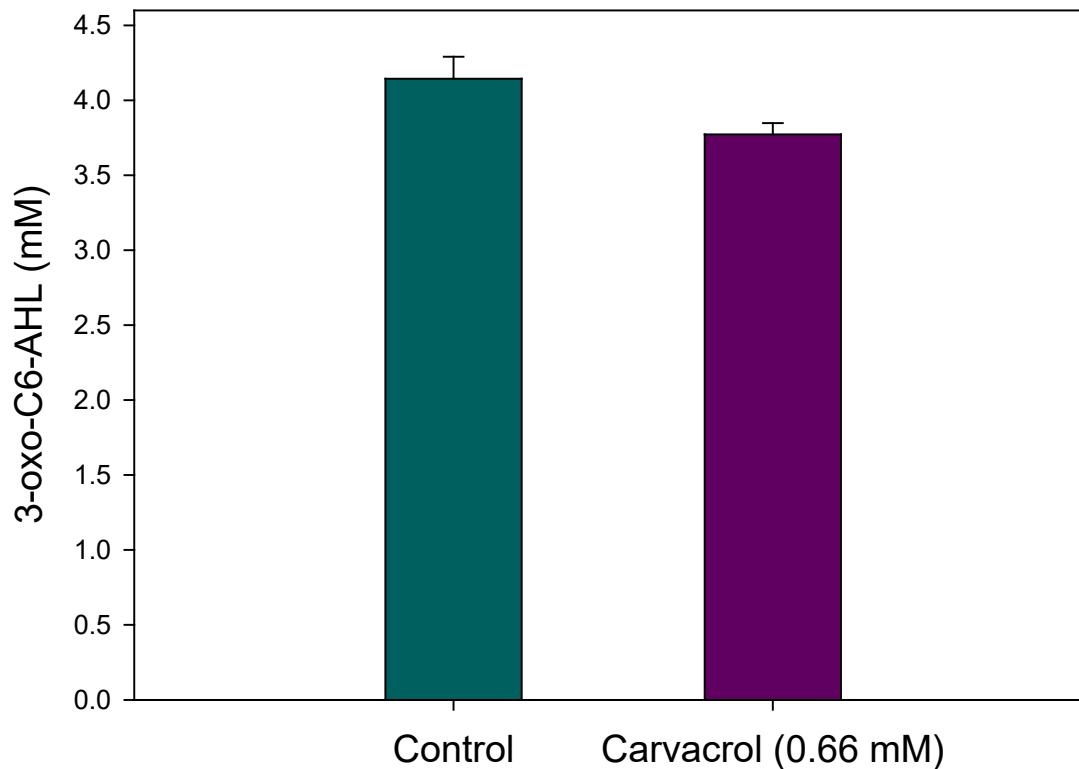


Figura 16. Efecto del carvacrol sobre la producción de 3-oxo-C6-AHL de *P. carotovorum* durante 24 h de incubación a 28 °C. Los valores son expresados como medias \pm DE, n=3. ($p \leq 0.05$).

Estos resultados concuerdan con las respuestas observadas previamente como lo son la reducción en la motilidad, formación de biopelículas, síntesis de SPE y exoenzimas. Como se mencionó anteriormente, estos factores de virulencia están regulados por el QS dependiente de AHL en *Pectobacterium* (Barnard *et al.* 2007); por lo tanto, una reducción en la síntesis de moléculas señal por efecto del carvacrol, concomitantemente redujo su expresión. Haciendo un análisis más detallado del efecto de la reducción de la AHL sobre los diferentes factores de virulencia, particularmente en la formación de biopelículas, se sabe que este proceso comprende una serie de etapas entre las cuales se destacan la adhesión de las bacterias a una superficie y la subsecuente síntesis de SPE que cumplen un papel fundamental en la formación del agregado, estructura y resistencia (Flemming y Wingender 2010).

Si bien, la forma en la que el QS regula dicho proceso no está bien esclarecido para *P. carotovorum*, se sabe que en *P. stewartii* (bacteria similar a *P. carotovorum*), en presencia de niveles umbral de AHL, el complejo RcsA/RcsB activa la expresión de genes *cps* relacionados con la síntesis de exopolisacáridos (Minogue *et al.* 2005). Sin embargo, es posible que la reducción en la concentración de 3-oxo-C6-AHL por efecto del carvacrol haya favorecido la actividad represora de la proteína EsaR (como se observa en la Figura 5) inhibiendo la transcripción del gen *rcaA* que codifica para la proteína RcsA, y por lo tanto, haya reducido la síntesis de SPE y la concomitante formación de biopelículas.

Por otra parte, se sabe que el QS regula la síntesis de exoenzimas de manera dependiente de la concentración de AHL en el medio. En *P. carotovorum*, a una densidad poblacional baja, las proteínas receptoras ExpR inhiben la virulencia en ausencia de niveles umbral de AHLs por regular positivamente *rsmA*, que codifica para RsmA, una proteína que desestabiliza los transcritos de las exoenzimas. De manera normal, las AHLs interactúan con las proteínas ExpR, impidiendo la activación del gen *rsmA* y por lo tanto, las exoenzimas son sintetizadas (Pöllumaa *et al.* 2012). Sin embargo, es posible que en el presente estudio, la reducción en la concentración de 3-oxo-C6-AHL haya dejado libres las proteínas ExpR para ejercer su efecto inhibitorio y se haya reducido la síntesis de exoenzimas. Es importante destacar, que la reducción en la concentración de 3-oxo-C6-AHL puede ser atribuida a una inhibición de su síntesis y no a una menor densidad poblacional ya que en el presente estudio se utilizó una concentración no biocida y que además no afectara el crecimiento de la bacteria.

Estos resultados se pueden complementar con la evidencia previa que muestra el papel fundamental de las AHL en estos procesos. Tal es el caso de von Bodman *et al.* (2003) quienes encontraron que la supresión del gen *expI* en *P. carotovorum* eliminaba la síntesis de AHL y la producción de SPE, lo cual se reflejó directamente en una reducción de la virulencia. De igual manera, Lee *et al.* (2013) mostraron que en ausencia de AHL se redujo la formación de biopelículas y se suprimió la síntesis de exoenzimas. Como se mencionó anteriormente, 3-oxo-C6-AHL es sintetizada por la proteína ExpI y su acumulación activa la expresión del gen de virulencia dependiente del QS. En este sentido, es posible que el carvacrol haya disminuido la síntesis de AHL por su interacción con la proteína sintasa ExpI. Por lo tanto, se determinaron las posibles interacciones entre el carvacrol y ExpI con la finalidad de tener un acercamiento al posible mecanismo de acción del carvacrol en base a las respuestas observadas previamente.

6.3.2. Modelaje Molecular Entre Carvacrol y ExpI de *P. carotovorum*

El modelo estructural de ExpI se usó para su acoplamiento con SAM (ligando natural) y carvacrol (inhibidor). Este modelo se obtuvo mediante el software Phyre2, basado en la estructura cristalográfica de EsaI de *P. stewartii*, con la cual mostró un 43% de homología. Este modelo se superpuso sobre la estructura cristalográfica de EsaI, pudiéndose observar la similitud entre ambas y la conservación de algunos de los aminoácidos implicados en la síntesis de AHL (Figura 17). Se modelaron las estructuras de SAM y carvacrol con el fin de detectar las posibles interacciones entre estos y ExpI y así, explicar las respuestas obtenidas previamente donde se observa la reducción de factores de virulencia regulados por esta proteína.



Figura 17. Homología del modelo estructural de ExpI de *P. carotovorum* con la estructura cristalográfica de EsaI (PDB 1KZF) de *P. stewartii*. Algunos aminoácidos importantes en la actividad catalítica y reconocimiento de sustratos (Phe102, Phe123, Val104, Met146, Arg101, Ser99) se muestran en barras mientras que ExpI y EsaI en listones amarillos y azules, respectivamente.

El modelo de acoplamiento reflejó que ambos compuestos interactúan de forma no covalente con aminoácidos presentes en el sitio de unión a la cadena de acilo de ExpI y que participan en el reconocimiento del sustrato y actividad enzimática. Específicamente, SAM mostró interacciones hidrofóbicas (tipo alquil-pi) con Met77 y puentes de hidrógeno con Arg101, Ile142, Ser99, Ser100, y Thr141 (Figura 18A); mientras que el carvacrol, dadas sus características hidrofóbicas interactuó predominantemente con Phe102 (pi-pi), Met147 (alquil), Val143 (alquil) y Leu177 (alquil), y por puentes de hidrógeno con Ser99 y Ser100 (Figura 18B). SAM presentó una mayor energía de afinidad con respecto al carvacrol (Cuadro 6), lo cual era de esperarse considerando que es el ligando natural.

Recordando un poco el mecanismo de síntesis de AHL mencionado anteriormente y basándonos en el modelo de EsaI reportado por Watson *et al.* (2002), ExpI cataliza la reacción entre SAM y la cadena de acilo transportada por ACP. La cadena 3-oxo-hexanoil del sustrato se acomoda en la cavidad hidrofóbica de ExpI e interactúa con los residuos conservados que lo colocan en la orientación adecuada para la catálisis. Ser99, Met126, Thr141, Val143, Met147 y Leu177 alinean esta cavidad y la cadena hidrocarbonada es estabilizada por interacciones hidrofóbicas con Leu118, Ser119 y Met147. Posteriormente, el proceso de acilación se da por el ataque nucleofílico del carbono carbonilo de la cadena de acilo por los electrones libres del grupo amino de SAM (después de la abstracción de uno de sus protones por una molécula de agua estabilizada por Ser99) (Watson *et al.* 2002). En este sentido, es posible que al interactuar el carvacrol con estos aminoácidos, haya impedido el reconocimiento de la cadena de acilo por la enzima. De igual manera, la interacción entre el carvacrol y Ser99 puede tener un impacto en la desprotonación de SAM impidiendo el ataque nucleofílico y el proceso de acilación afectando la síntesis de AHL con la concomitante reducción en los factores de virulencia observada previamente.

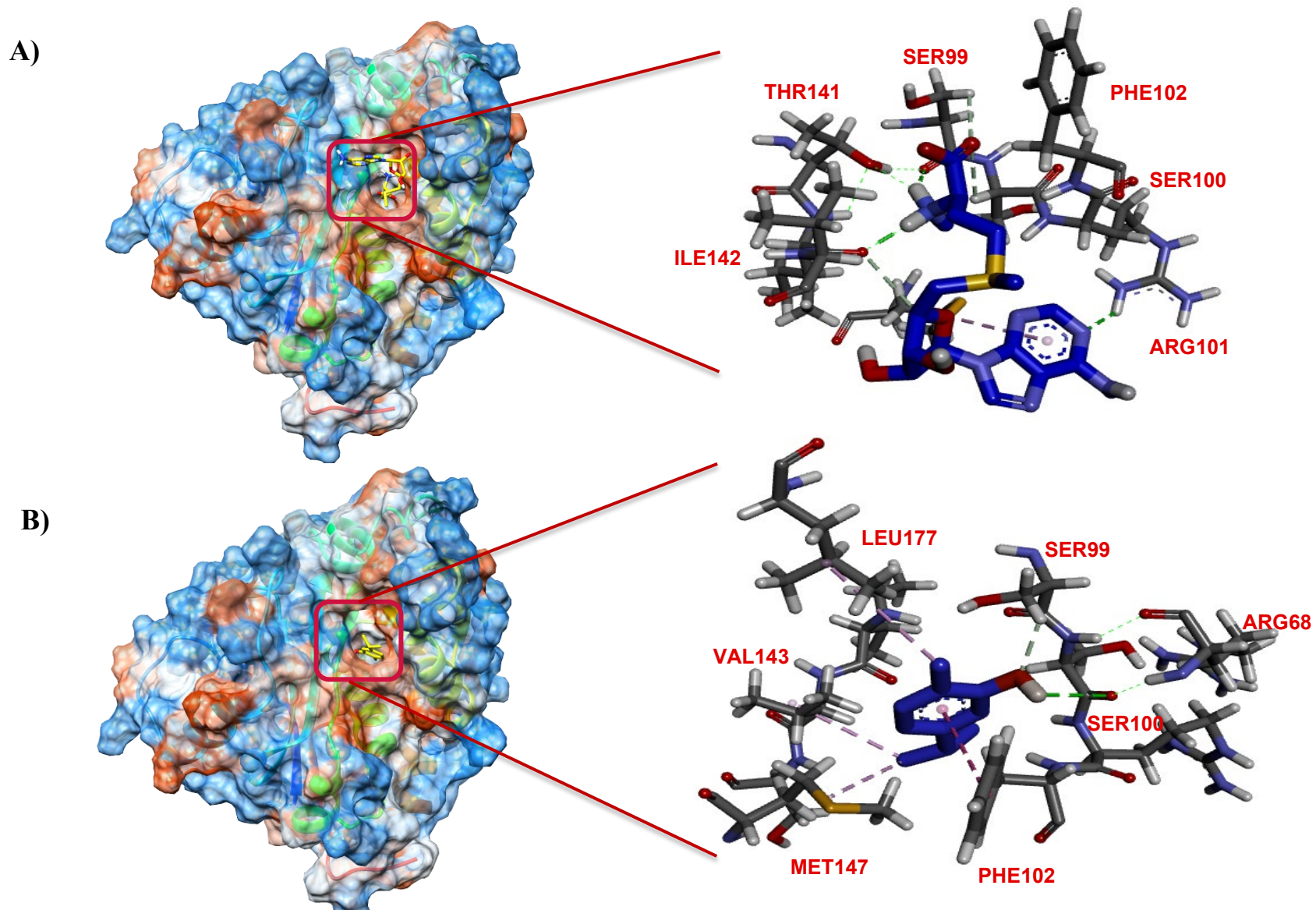


Figura 18. Modelaje molecular de SAM (A) y carvacrol (B) en el sitio de unión a acil-ACP de ExpI. Se muestran interacciones hidrofóbicas (líneas moradas) y puentes de hidrógeno (líneas verdes) entre el carvacrol y los aminoácidos del sitio catalítico de ExpI.

Cuadro 6. Energía de afinidad e interacciones principales obtenidas del modelaje molecular entre SAM, carvacrol y Expl.

Ligando	Energía de afinidad (kcal/mol)	Interacciones principales
SAM	-5.9	Hidrofóbicas: Met77 Puentes de hidrógeno: Arg101, Ile142, Ser99, Ser100, Thr141
Carvacrol	-4.7	Hidrofóbicas: Phe102, Met147, Val143, Leu177 Puentes de hidrógeno: Ser99, Ser100

7. CONCLUSIÓN

El carvacrol fue efectivo para inhibir la formación de biopelículas de *P. carotovorum*, disminuyendo la motilidad, síntesis de SPE y adhesión celular. Adicionalmente, se observó un efecto inhibitorio en la síntesis de exoenzimas e incidencia de la enfermedad causada por *P. carotovorum* en tejidos de papa. La capacidad inhibitoria del carvacrol sobre los factores de virulencia de *P. carotovorum* se atribuyó a una reducción de la síntesis de AHLs por su posible interacción con la proteína sintasa ExpI. Estos resultados resaltan el potencial del carvacrol como agente antibacteriano y anti-virulencia para ser usado como tratamiento desinfectante en superficies bióticas y abióticas.

8. BIBLIOGRAFIA

- Absolom, D. R., F. V. Lamberti, Z. Policova, W. Zingg, C. J. van Oss and A. W. Neumann (1983). Surface thermodynamics of bacterial adhesion. Applied Environmental Microbiology 46(1): 90-97.
- Ahmer, B. M. (2004). Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Molecular Microbiology 52(4): 933-945.
- Barnard, A. M., S. D. Bowden, T. Burr, S. J. Coulthurst, R. E. Monson and G. P. Salmond (2007). Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 362(1483): 1165-1183.
- Bayouhdh, S., A. Othmane, F. Bettaieb, A. Bakhrouf, H. B. Ouada and L. Ponsonnet (2006). Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. Materials Science and Engineering 26(2-3): 300-305.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72(1-2): 248-254.
- Briandet, R., T. Meylheuc, C. Maher and M. N. Bellon-Fontaine (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. Applied Environmental Microbiology 65(12): 5328-5333.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology 94(3): 223-253.
- Burt, S. A., V. T. Ojo-Fakunle, J. Woertman and E. J. Veldhuizen (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. PLoS One 9(4): e93414.
- Burt, S. A., R. van der Zee, A. P. Koets, A. M. de Graaff, F. van Knapen, W. Gaastra, H. P. Haagsman and E. J. Veldhuizen (2007). Carvacrol induces heat shock protein and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. Applied Environmental Microbiology 73(14): 4484-4490.
- Crépin, A., A. Beury-Cirou, C. Barbey, C. Farmer, V. Hélias, J. F. Burini, D. Faure and X. Latour (2012). N-Acyl Homoserine Lactones in Diverse *Pectobacterium* and *Dickeya* Plant Pathogens: Diversity, Abundance, and Involvement in Virulence. Sensors 12(3): 3484-3497.
- Creze, C., S. Castang, E. Derivery, R. Haser, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, V. E. Shevchik and P. Gouet (2008). The crystal structure of pectate lyase peli from soft rot pathogen *Erwinia chrysanthemi* in complex with its substrate. Journal of Biological Chemistry 283(26): 18260-18268.
- Czaczyk, K. and K. Myszka (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. Polish Journal of Environmental Studies 16(6).

- Czajkowski, R., M. C. Perombelon, J. A. van Veen and J. M. van der Wolf (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. Plant Pathology 60(6): 999-1013.
- Chamdit, S. and P. Siripermpool (2012). Antimicrobial effect of clove and lemongrass oils against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science 39(2): 28-36.
- Chang, C. Y., T. Krishnan, H. Wang, Y. Chen, W. F. Yin, Y.-M. Chong, L. Y. Tan, T. M. Chong and K. G. Chan (2014). Non-antibiotic quorum sensing inhibitors acting against N-acyl homoserine lactone synthase as druggable target. Scientific reports 4: 7245.
- Danhorn, T. and C. Fuqua (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Reviews in Microbiology 61: 401-422.
- Davies, D. G., A. M. Chakrabarty and G. G. Geesey (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Environmental Microbiology 59(4): 1181-1186.
- Din, A., S. Parveen, M. A. Ali and A. Salam (2011). Safety issues in fresh fruits and vegetables-A review. Pakistan Journal of Food Sciences 21(1-4): 1-6.
- Dong, Y. H., X. F. Zhang, J. L. Xu and L. H. Zhang (2004). Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. Applied Environmental Microbiology 70(2): 954-960.
- Duan, Q., M. Zhou, L. Zhu and G. Zhu (2013). Flagella and bacterial pathogenicity. Journal of Basic Microbiology 53(1): 1-8.
- FAO. (2015). Keeping plant pests and diseases at bay: experts focus on global measures. from <http://www.fao.org/news/story/en/item/280489/icode/>.
- FAOSTAT (2016). Production indices.
- Flemming, H. C. and J. Wingender (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews in Microbiology 8(9): 623.
- Garrett, T. R., M. Bhakoo and Z. Zhang (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science 18(9): 1049-1056.
- Gohlke, J. and R. Deeken (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. Frontiers in Plant Science 5: 155.
- Gutierrez-Pacheco, M. M, G. A. Gonzalez-Aguilar, M. A. Martinez-Tellez, J. Lizardi-Mendoza, T. J. Madera-Santana, A. T. Bernal-Mercado, F. J. Vazquez-Armenta and J. F. Ayala-Zavala (2018). Carvacrol inhibits biofilm formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Food Control 89: 210-218.
- Guttenplan, S. B. and D. B. Kearns (2013). Regulation of flagellar motility during biofilm formation. FEMS Microbiology Reviews 37(6): 849-871.
- Hajian-Maleki, H., S. Baghaee-Ravari and M. Moghaddam (2019). Efficiency of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing potato soft rot and their possible application as coatings in storage. Postharvest Biology and Technology 156: 110928.

- Hamilton, A. J., F. Stagnitti, R. Premier, A.-M. Boland and G. Hale (2006). Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. Applied Environmental Microbiology 72(5): 3284-3290.
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. Annual Reviews in Microbiology 57(1): 249-273.
- He, Y. W., J. E. Wu, J. S. Cha and L. H. Zhang (2010). Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production." BMC Microbiology 10(1): 187.
- Herron, S. R., J. A. Benen, R. D. Scavetta, J. Visser and F. Journak (2000). Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences 97(16): 8762-8769.
- Hossain, M. M., S. Shibata, S. I. Aizawa and S. Tsuyumu (2005). Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*." Physiological and Molecular Plant Pathology 66(4): 134-143.
- Hosseinzadeh, S., M. Shams-Bakhsh and E. Hosseinzadeh (2013). Effects of sub-bactericidal concentration of plant essential oils on pathogenicity factors of *Ralstonia solanacearum*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 46(6): 643-655.
- Inamuco, J., A. K. Veenendaal, S. A. Burt, J. A. Post, J. L. Tjeerdsma-van Bokhoven, H. P. Haagsman and E. J. Veldhuizen (2012). Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella* Typhimurium motility and invasion of porcine epithelial cells. Veterinary Microbiology 157(1-2): 200-207.
- Ionescu, M., C. Baccari, A. M. Da Silva, A. Garcia, K. Yokota and S. E. Lindow (2013). The XfDSF synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* is a multi-function protein also required for response to XfDSF. Journal of Bacteriology: 00713-00713.
- Jahn, C. E., D. A. Selimi, J. D. Barak and A. O. Charkowski (2011). The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon. Microbiology 157(10): 2733-2744.
- Joshi, J. R., S. Burdman, A. Lipsky and I. Yedidia (2015). Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium*. Research in Microbiology 166(6): 535-545.
- Joshi, J. R., N. Khazanov, H. Senderowitz, S. Burdman, A. Lipsky and I. Yedidia (2016). Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in pectobacteria and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. Scientific Reports 6: 38126.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. Nature Reviews Microbiology 8: 634.
- Kim, J., J. G. Kim, Y. Kang, J. Y. Jang, G. J. Jog, J. Y. Lim, S. Kim, H. Suga, T. Nagamatsu and I. Hwang (2004). Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. Molecular Microbiology 54(4): 921-934.

- Koczan, J. M., M. J. McGrath, Y. Zhao and G. W. Sundin (2009). Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. Phytopathology 99(11): 1237-1244.
- Koutsoudis, M. D., D. Tsaltas, T. D. Minogue and S. B. von Bodman (2006). Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(15): 5983-5988.
- Kumar, J. S., S. Umesha, K. S. Prasad and P. Niranjana (2016). Detection of quorum sensing molecules and biofilm formation in *Ralstonia solanacearum*. Current Microbiology 72(3): 297-305.
- Kwok, D. and A. W. Neumann (2000). Contact angle interpretation in terms of solid surface tension. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 161(1): 31-48.
- Kwok, D. Y. and A. W. Neumann (1999). Contact angle measurement and contact angle interpretation. Advances in Colloid and Interface Science 81(3): 167-249.
- Laasik, E., M. Ojarand, M. Pajunen, H. Savilahti and A. Mäe (2005). Novel mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* defective in the production of plant cell wall degrading enzymes generated by Mu transpososome-mediated insertion mutagenesis. FEMS Microbiology Letters 243(1): 93-99.
- Lagonenko, L., A. Lagonenko and A. Evtushenkov (2013). Impact of salicylic acid on biofilm formation by plant pathogenic bacteria. Journal of Biology and Earth Sciences 3(2): 176-181.
- Langlotz, C., M. Schollmeyer, D. L. Coplin, M. Nimtz and K. Geider (2011). Biosynthesis of the repeating units of the exopolysaccharides amylovoran from *Erwinia amylovora* and stewartan from *Pantoea stewartii*. Physiological and Molecular Plant Pathology 75(4): 163-169.
- Lee, D. H., J.-A. Lim, J. Lee, E. Roh, K. Jung, M. Choi, C. Oh, S. Ryu, J. Yun and S. Heu (2013). Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage. Microbiology 159(Pt 7): 1487.
- Lejeune, P. (2003). Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. Trends in Microbiology 11(4): 179-184.
- Li, J. and L. McLandsborough (1999). The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. International Journal of Food Microbiology 53(2-3): 185-193.
- Licciardello, G., I. Bertani, L. Steindler, P. Bella, V. Venturi and V. Catara (2007). *Pseudomonas corrugata* contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response. FEMS Microbiology Ecology 61(2): 222-234.
- Liu, H., S. J. Coulthurst, L. Pritchard, P. E. Hedley, M. Ravensdale, S. Humphris, T. Burr, G. Takle, M.-B. Brurberg and P. R. Birch (2008). Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. PLoS Pathogens 4(6): e1000093.

- Liu, H. and H. H. Fang (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. Journal of Biotechnology 95(3): 249-256.
- Mansfield, J., S. Genin, S. Magori, V. Citovsky, M. Sriariyanum, P. Ronald, M. Dow, V. Verdier, S. V. Beer and M. A. Machado (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13(6): 614-629.
- Masuko, T., A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S. I. Nishimura and Y. C. Lee (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. Analytical Biochemistry 339(1): 69-72.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. Annual Reviews in Microbiology 56(1): 289-314.
- Mattiuzzo, M., I. Bertani, S. Ferluga, L. Cabrio, J. Bigirimana, C. Guarnaccia, S. Pongor, H. Maraitte and V. Venturi (2011). The plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* contains two conserved quorum sensing systems involved in virulence and negatively regulated by RsaL and the novel regulator RsaM. Environmental Microbiology 13(1): 145-162.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31(3): 426-428.
- Minogue, T. D., A. L. Carlier, M. D. Koutsoudis and S. B. Von Bodman (2005). The cell density-dependent expression of stewartan exopolysaccharide in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* is a function of EsaR-mediated repression of the *rcsA* gene. Molecular Microbiology 56(1): 189-203.
- Mole, B. M., D. A. Baltrus, J. L. Dangel and S. R. Grant (2007). Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. Trends in Microbiology 15(8): 363-371.
- Nasser, W., C. Dorel, J. Wawrzyniak, F. Van Gijsegem, M. C. Groleau, E. Déziel and S. Reverchon (2013). Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii*. Environmental Microbiology 15(3): 865-880.
- Noel, J. T., J. Joy, J. N. Smith, M. Fatica, K. R. Schneider, B. M. M. Ahmer and M. Teplitski (2010). *Salmonella* SdiA Recognizes N-acyl Homoserine Lactone Signals from *Pectobacterium carotovorum* in Vitro, but Not in a Bacterial Soft Rot. Molecular Plant-Microbe Interactions 23(3): 273-282.
- Oerke, E. (2006). Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science 144(1): 31-43.
- Olasupo, N., D. Fitzgerald, M. Gasson and A. Narbad (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Letters in Applied Microbiology 37(6): 448-451.
- Ortega-Ramirez, L. A., I. Rodriguez-Garcia, J. M. Leyva, M. R. Cruz-Valenzuela, B. A. Silva-Espinoza, G. A. Gonzalez-Aguilar, M. W. Siddiqui and J. F. Ayala-Zavala (2014). Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. Journal of Food Science 79(2): R129-R137.
- Pérombelon, M. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathology 51(1): 1-12.
- Pérombelon, M. C. M. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathology 51(1): 1-12.

- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. Journal of Computational Chemistry 25(13): 1605-1612.
- Pieretti, I., M. Royer, V. Barbe, S. Carrere, R. Koebnik, A. Couloux, A. Darrasse, J. Gouzy, M.-A. Jacques and E. Lauber (2012). Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. BMC Genomics 13(1): 658.
- Pöllumaa, L., T. Alamäe and A. Mäe (2012). Quorum sensing and expression of virulence in pectobacteria. Sensors 12(3): 3327-3349.
- Prigent-Combaret, C., O. Vidal, C. Dorel and P. Lejeune (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 181(19): 5993-6002.
- Quiñones, B., G. Dulla and S. E. Lindow (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. Molecular Plant-Microbe Interactions 18(7): 682-693.
- Sakuragi, Y. and R. Kolter (2007). Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 189(14): 5383-5386.
- Shau-Ping, L., L. Hun-Chi, L. Heffernan and G. Wilcox (1985). Cloning of the pectate lyase genes from *Erwinia carotovora* and their expression in *Escherichia coli*. Gene 35(1-2): 63-70.
- Sivaranjani, M., S. R. Krishnan, A. Kannappan, M. Ramesh and A. V. Ravi (2016). Curcumin from *Curcuma longa* affects the virulence of *Pectobacterium wasabiae* and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* via quorum sensing regulation." European Journal of Plant Pathology 146(4): 793-806.
- Smadja, B., X. Latour, D. Faure, S. Chevalier, Y. Dessaux and N. Orange (2004). Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). Molecular Plant-Microbe Interactions 17(11): 1269-1278.
- Speth, E. B., Y. N. Lee and S. Y. He (2007). Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. Current Opinion in Plant Biology 10(6): 580-586.
- Srey, S., I. K. Jahid and S. D. Ha (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. Food Control 31(2): 572-585.
- Steenackers, H., K. Hermans, J. Vanderleyden and S. C. De Keersmaecker (2012). Salmonella biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research International 45(2): 502-531.
- Stepanović, S., I. Ćirković, L. Ranin and M. S vabić-Vlahović (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology 38(5): 428-432.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies and J. W. Costerton (2002). Biofilms as complex differentiated communities. Annual Reviews in Microbiology 56(1): 187-209.
- Strange, R. N. and P. R. Scott (2005). Plant disease: a threat to global food security. Annual Reviews in Phytopathology 43: 83-116.

- Tapia-Rodriguez, M. R., A. T. Bernal-Mercado, M. M. Gutierrez-Pacheco, F. J. Vazquez-Armenta, A. Hernandez-Mendoza, G. A. Gonzalez-Aguilar, M. A. Martinez-Tellez, F. Nazzaro and J. F. Ayala-Zavala (2019). Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to carvacrol: alterations of the Quorum sensing at enzymatic and gene levels." Journal of Cell Communication and Signaling.
- Tapia-Rodriguez, M. R., A. Hernandez-Mendoza, G. A. Gonzalez-Aguilar, M. A. Martinez-Tellez, C. M. Martins and J. F. Ayala-Zavala (2017). Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. Food Control 75: 255-261.
- Tondo, E. C., T. R. M. Machado, P. d. S. Malheiros, D. K. Padrão, A. L. d. Carvalho and A. Brandelli (2010). Adhesion and biocides inactivation of Salmonella on stainless steel and polyethylene. Brazilian Journal of Microbiology 41(4): 1027-1037.
- Toth, I. K., K. S. Bell, M. C. Holeva and P. R. Birch (2003). Soft rot erwiniae: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology 4(1): 17-30.
- Truchado, P., A. Gil-Izquierdo, F. Tomas-Barberan and A. Allende (2009). Inhibition by chestnut honey of N-Acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(23): 11186-11193.
- Truchado, P., F. A. Tomás-Barberán, M. Larrosa and A. Allende (2012). Food phytochemicals act as quorum sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*." Food Control 24(1-2): 78-85.
- Tuson, H. H. and D. B. Weibel (2013). Bacteria–surface interactions. Soft Matter 9(17): 4368-4380.
- Uchida, N. S., R. Grespan, M. Piovezan, E. C. Ferreira, M. M. Júnior, R. K. Cuman and J. M. Mikcha (2015). Effect of carvacrol on *Salmonella* Saintpaul biofilms on stainless steel surface. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 14(6): 1075-1079.
- Van Houdt, R. and C. W. Michiels (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. Journal of Applied Microbiology 109(4): 1117-1131.
- Vargas, P., G. A. Farias, J. Nogales, H. Prada, V. Carvajal, M. Barón, R. Rivilla, M. Martín, A. Olmedilla and M. T. Gallegos (2013). Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC 3000 flagella and type III secretion system. Environmental Microbiology Reports 5(6): 841-850.
- Vattem, D., K. Mihalik, S. Crixell and R. McLean (2007). Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. Fitoterapia 78(4): 302-310.
- Vazquez-Armenta, F., A. Bernal-Mercado, J. Lizardi-Mendoza, B. Silva-Espinoza, M. Cruz-Valenzuela, G. Gonzalez-Aguilar, F. Nazzaro, F. Fratianni and J. Ayala-Zavala (2018). Phenolic extracts from grape stems inhibit *Listeria monocytogenes* motility and adhesion to food contact surfaces. Journal of Adhesion Science and Technology 32(8): 889-907.
- Venturi, V., C. Venuti, G. Devescovi, C. Lucchese, A. Friscina, G. Degrassi, C. Aguilar and U. Mazzucchi (2004). The plant pathogen *Erwinia amylovora* produces acyl-homoserine lactone signal molecules in vitro and in planta. FEMS Microbiology Letters 241(2): 179-183.

- Vidaver, A. K. (2001). Phytopathology. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons.
- von Bodman, S. B., W. D. Bauer and D. L. Coplin (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology 41(1): 455-482.
- Wang, X. Y., L. Zhou, J. Yang, G. H. Ji and Y. W. He (2016). The RpfB-dependent quorum sensing signal turnover system is required for adaptation and virulence in rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interactions 29(3): 220-230.
- Watson, W. T., T. D. Minogue, D. L. Val, S. B. von Bodman and M. E. Churchill (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. Molecular Cell 9(3): 685-694.
- Yaron, S. and U. Römling (2014). Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. Microbial Biotechnology 7(6): 496-516.
- Zhang, X., Q. Zhang, T. Yan, Z. Jiang, X. Zhang and Y. Y. Zuo (2015). Quantitatively predicting bacterial adhesion using surface free energy determined with a spectrophotometric method. Environmental Science and Technology 49(10): 6164-6171.
- Zhang, Y., J. Kong, Y. Xie, Y. Guo, Y. Cheng, H. Qian and W. Yao (2018). Essential oil components inhibit biofilm formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity. LWT 92: 133-139.