



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

**ACEITE ESENCIAL DE CLAVO (*Syzygium aromaticum*)
EN COMBINACIÓN CON IRRADIACIÓN UV-C PARA LA
ERRADICACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Salmonella*
*Typhimurium***

Por:

JULIÁN JAVIER PALOMARES NAVARRO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Agosto del 2016

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Julián Javier Palomares Navarro, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



M.C. Brenda Adriana Silva Espinoza
Director de Tesis


Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Asesor


Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Asesor



M.C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis 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 del autor, 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 del Director 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 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. (CIAD) por permitirme realizar mis estudios de maestría y por prestarme sus instalaciones.

A la Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) por facilitarme equipos y materiales para realizar mi proyecto de investigación, además de comentarios y sugerencias durante esta etapa.

A mi comité de tesis encabezado por M.C. Brenda Adriana Silva Espinoza y a los demás miembros: Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, M. C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela y Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar, por sus comentarios, sugerencias y apoyo durante este tiempo.

Al departamento de Docencia y Posgrado por brindarme sus servicios y apoyos. Así como a todos mis maestros docentes que ayudaron en mi formación de maestro en ciencias.

A Dra. Erika Silva Campa por el apoyo y asesorías brindadas con los análisis de microscopias de mi proyecto de investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Tecnologías Emergentes: Thalía, Valeria, Melvin, Melissa, Luis, Pancho y Aimara, por brindarme su apoyo durante la realización de mi tesis y hacer más agradable todo este tiempo.

DEDICATORIA

A Dios por estar conmigo cada día.

A mis padres por el gran esfuerzo, sacrificios, confianza y amor que han depositado en mí y por apoyarme de manera incondicional durante cada etapa de mi vida y en especial en este logro.

A mi hermana por todo el apoyo y motivación que me ha dado siempre para seguir adelante.

A mi familia por siempre estar conmigo y el cariño que me han brindado durante toda mi vida.

A mis amigos Ramón Laguna, Ramón Piri, Cota y Moisés por los buenos momentos que hemos pasado y el apoyo que me han dado estos últimos años que han sido de gran importancia para no olvidar que también hay divertirse.

A Thalía por ser una pequeña gran persona que me ha apoyado durante este último semestre más que nadie.

A Yuri y Carmen por ser muy buenas amigas y ayudarme bastante durante mi primer año de maestría en muchos aspectos, además de la confianza y tiempo que me han dado.

A mis compañeros de generación Cynthia, Cristóbal, Deyanira, Rocío, Ariel, Rodrigo, Víctor, Alejandra y Karen por los buenos momentos que pasamos durante la maestría, sin olvidar la ayuda y asesorías que en algún momento me dieron

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Formación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	4
2.1.1. Adhesión Inicial.....	4
2.1.2. Adhesión Irreversible	6
2.1.3. Maduración	7
2.1.4. Dispersión.....	8
2.2. Impacto de las Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> en la Industria Alimentaria	8
2.3. Control de Biopelículas	11
2.3.1. Agentes Químicos.....	12
2.3.2. Aceite Esencial de Clavo como Antibacteriano Natural	16
2.3.3. Irradiación UV-C en el Control de Biopelículas Bacterianas	19
2.3.4. Tecnologías de Barrera	22
III. HIPOTESIS.....	24
IV. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo General.....	25
4.2. Objetivos Específicos.....	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Identificación de Compuestos Volátiles del AEC	26
5.2. Determinación de CMI y CMB de AEC y Eugenol contra Células Planctónicas.....	27

CONTENIDO (continuación)

5.3. Formación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> en Superficies de Acero Inoxidable	27
5.4. Efecto del AEC sobre Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> Formadas en Superficies de Acero Inoxidable.....	28
5.5. Efecto de la Irradiación UV-C sobre Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> Formadas en Superficies de Acero Inoxidable.....	28
5.6. Efecto del Aceite Esencial de Clavo e Irradiación UV-C sobre Biopelículas <i>S. Typhimurium</i> Formadas en Superficies de Acero Inoxidable.....	29
5.7. Conteo de Células de <i>S. Typhimurium</i> Adheridas a Acero Inoxidable.....	29
5.8. Análisis por Microscopía Laser Confocal de Barrido.....	30
5.9. Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica	30
5.10. Diseño Experimental y Análisis Estadístico	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.1. Etapa 1: Efecto del AEC Sobre Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	32
6.1.1. Identificación de Compuestos Volátiles del AEC	32
6.1.2. Actividad Antibacteriana del AEC y Eugenol contra Células Planctónicas	35
6.1.3. Formación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	37
6.1.4. Efecto de AEC sobre la Erradicación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	39
6.1.5. Análisis de Viabilidad Celular por Microscopía Laser Confocal De Barrido en Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> Tratadas con AEC	42
6.1.6. Análisis de Morfología Superficial de Biopelículas por AFM Tratadas con AEC.....	44
6.1.7. Conclusión Etapa 1	47
6.2. Etapa 2. Efecto de UV-C sobre Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	47
6.2.1. Efecto de Irradiación UV-C sobre la Erradicación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	47

CONTENIDO (continuación)

6.2.2. Análisis de Viabilidad Celular por Microscopía Laser Confocal De Barrido en Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> Irradiadas con UV-C.....	50
6.2.3. Análisis de Morfología Superficial de Biopelículas por AFM Tratadas con AEC.....	52
6.2.4. Conclusión Etapa 2.....	52
6.3. Etapa 3. Efecto del AEC en Combinación con UV-C sobre Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	55
6.3.1. Efecto del AEC en Combinación con Irradiación UV-C sobre la Erradicación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	55
6.3.2. Análisis de Viabilidad Celular por Microscopía Laser Confocal De Barrido en Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> Tratadas con AEC en Combinación con Irradiación UV-C.....	58
6.3.3. Análisis de Morfología Superficial de Biopelículas por AFM Tratadas con AEC en Combinación con Irradiación UV-C.....	58
6.3.4. Conclusión Etapa 3.....	62
VII. ESTUDIOS POSTERIORES	63
VIII. REFERENCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	Página
1 Representación de la formación de biopelícula bacteriana. Se observan las 4 etapas de desarrollo de una biopelícula: 1) adhesión inicial, 2) adhesión irreversible, 3) maduración, 4) dispersión.....	5
2 Interacciones entre eugenol (componente mayoritario del AEC) y la membrana celular bacteriana, provocando pérdida de contenido celular.....	18
3 Perfil de volátiles de AEC. 1) Copaeno, 2) Benzaldehído, 3) Cariofileno, 4) α -Cariofileno, 5) δ -Cadineno, 6) Óxido de cariofileno 7) Eugenol, 8) Isoeugenol.....	33
4 Formación de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> de 0 a 144 h sobre superficies de acero inoxidable. Diferentes literales indican diferencia significativa entre tiempos de incubación ($P \leq 0.05$). * No se detectaron células adheridas.....	38
5 Efecto del AEC sobre la erradicación de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> formadas durante 24 h. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). * No se detectaron células adheridas.....	40
6 Efecto del AEC sobre la erradicación de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> formadas durante 48 h. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).....	45
7 Efecto de la irradiación UV-C sobre la erradicación de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> formadas durante 48 h.....	48
8 Efecto de la combinación de AEC y UV-C sobre la erradicación de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> formadas durante 48 h. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).....	53
9 Micrografías por AFM de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> formadas por 48 h a) control b) AEC c) UV-C d) AEC + UV-C...	56
10 Micrografías por AFM de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> formadas por 48 h a) control b) AEC (0.6 mg/mL)+ UV-C (39.52 mJ/cm ²).....	60

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro</i>		Página
1	Brotos de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con <i>S. Typhimurium</i>	10
2	Agentes químicos para controlar biopelículas bacterianas.....	13
3	Efecto de la irradiación ultravioleta sobre la erradicación de biopelículas bacterianas.....	21
4	Contenido de compuestos volátiles del AEC determinado por cromatografía de gases-masas.....	34
5	Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas del aceite esencia de clavo sobre <i>S. Typhimurium</i>	36
6	Imágenes de microscopía confocal de barrido de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> tratadas con AEC. Barra de escala – 20 μm	43
7	Efecto del AEC sobre la morfología superficial de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> obtenidos por AFM.....	46
8	Imágenes de microscopía confocal de barrido de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> irradiadas con UV-C. Barra de escala – 20 μm	51
9	Efecto de irradiación UV-C sobre la morfología superficial de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> obtenidos por AFM.....	54
10	Imágenes de microscopía confocal de barrido de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> tratadas con AEC en combinación con irradiación UV-C. Barra de escala – 20 μm	59
11	Efecto del AEC en combinación con irradiación UV-C sobre la morfología superficial de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> obtenidos por AFM.....	61

RESUMEN

Salmonella Typhimurium es una bacteria enteropatógena capaz de formar biopelículas, lo cual otorga mayor resistencia a procesos de desinfección, haciendo necesario el aumentar las dosis efectivas para su erradicación. Por otro lado, el aceite esencial de clavo (AEC) ha demostrado tener un efecto antibacteriano contra *S. Typhimurium* en células planctónicas, sin ser evaluado contra biopelículas. Existiendo evidencia que indica que los terpenos presentes en aceites esenciales pueden afectar la estructura del agregado haciéndolo más sensible al efecto de tratamientos sucesivos. En este punto, se propuso a la irradiación UV tipo C como tratamiento aditivo al AEC para mejorar la capacidad de erradicación de biopelículas de *S. Typhimurium* en comparación con su aplicación individual. El componente principal del AEC fue eugenol (82.5%), seguido de cariofileno (9.97%), isoeugenol (4.192%) y α -cariofileno (2.10%). Los resultados mostraron que los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) contra células planctónicas fueron de 0.4 y 0.6 mg/mL, respectivamente. La concentración de 1.2 mg/mL del AEC logró reducir 1.83 log UFC/cm² de acero inoxidable utilizado como sustrato, respecto al control (6.11 log UFC/cm²), mientras que a la dosis más alta utilizada de 620.4 mJ/cm² de irradiación UV-C se encontraron 3.12 log UFC/cm². Una vez realizada la combinación del AEC (1.2 mg/mL) con la irradiación UV-C (76.41 mJ/cm²) se logró una erradicación total del agregado bacteriano. Los resultados de este estudio demostraron el efecto sinérgico de la combinación del AEC y la irradiación UV-C para erradicar biopelículas de *S. Typhimurium*.

Palabras clave: Concentración mínima inhibitoria, Concentración mínima bactericida, Microscopía confocal de barrido, Microscopía de Fuerza Atómica, Cromatografía de gases.

ABSTRACT

Salmonella Typhimurium is an enteropathogenic bacteria able to form biofilms, which gives greater resistance to disinfection processes, making it necessary to increase the effective doses for its eradication. On the other hand, clove essential oil (CEO) possess an antibacterial effect against *S. Typhimurium* on its planktonic state, without being evaluated against biofilms. There is evidence that the terpenes present in essential oils may affect this aggregated structure making it more sensitive to the effect of successive treatments. At this point, UV irradiation type C was proposed as an additive treatment to CEO, improving their ability to eradicate biofilms of *S. Typhimurium* compared to single technologies. Eugenol was the main component of CEO (82.5%), followed by caryophyllene (9.97%), isoeugenol (4.192%) and α -caryophyllene (2.10%). Results showed that the values of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of CEO against planktonic cells were 0.4 and 0.6 mg/mL, respectively. The concentration of 1.2 mg/mL of CEO was able to reduce 1.83 log CFU/cm² of stainless steel used as the substrate, compared to control (6.11 log CFU/cm²), while at the maximum dose applied of 620.4 mJ/cm² of UV-C irradiation a 2.99 log CFU/cm² reduction was achieved. Combination of CEO with UV-C achieved a total bacterial eradication with doses of 1.2 mg/mL and 76.41 mJ/cm², respectively. Results of this study demonstrated the synergistic effect of the combination of CEO and UV-C irradiation to eradicate biofilms of *S. Typhimurium*.

Keywords: Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration, Microscopy confocal scanning, Atomic Force Microscopy, Gas chromatography.

I. INTRODUCCIÓN

Salmonella Typhimurium es una bacteria bacilo Gram negativa, anaerobia facultativa, con flagelos peritricos y agente causal de salmonelosis. Las fuentes más frecuentes de infección son los alimentos crudos o mal cocidos, especialmente los alimentos que contienen huevo, destacándose la importancia de controlar la elaboración de alimentos (López et al., 2012). La salmonelosis se estima que causa más de 1.2 millones de enfermedades cada año en los Estados Unidos, con más de 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes (CDC, 2015). Las infecciones por *Salmonella* con mayor frecuencia causan gastroenteritis, que puede variar de leve a grave. Sin embargo, las infecciones invasivas también pueden ocurrir y puede ser grave y potencialmente mortal.

De los aproximadamente 2,500 serotipos de *Salmonella* Gram-negativas, *S. Typhimurium* es el serotipo más frecuentemente aislado, que representa alrededor del 35% de los aislamientos humanos que han sido reportados (Nguyen et al., 2014). Aunque la adhesión es una ventaja y tal vez sea necesario para su supervivencia en el medio natural, la capacidad de los microorganismos para adherirse a las superficies y formar biopelículas plantea un riesgo significativo para la industria alimentaria (Nguyen, Yang et al., 2014). Por ejemplo, el deterioro del producto, la reducción de la eficiencia de producción, la corrosión, olores desagradables, la infección, la contaminación biológica y fallo del equipo pueden ser efectos perjudiciales de biopelículas.

La persistencia de las células dentro de una biopelícula ha sido demostrada al ser más resistentes a los biocidas que las células planctónicas

(Van Houdt y Michiels, 2010). Puesto que, los microorganismos al adherirse a superficies comienzan a multiplicarse y a crear una matriz viscosa compuesta de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) en la cual se envuelven (Srey et al., 2013). Por lo tanto, la formación de biopelículas de las bacterias conduce a infecciones resistentes al tratamiento antimicrobiano convencional y es hoy en día una causa importante de fracaso de los tratamientos (Römling y Balsalobre, 2012).

La aparición de cepas bacterianas resistentes y la percepción de los consumidores sobre el uso de desinfectantes químicos, han puesto presión sobre la industria de alimentos para encontrar sustitutos antimicrobianos naturales para agentes sintéticos (Leonard et al., 2010). Entre las alternativas naturales a los antimicrobianos convencionales los aceites esenciales han demostrado tener un alto potencial antibacteriano el cual ha sido probado por varios autores (Chamdit y Siripermpool, 2012; Leonard et al., 2010; Naveed et al., 2013a). En particular, el aceite esencial de clavo (AEC) ha presentado actividad antibiopelícula, atribuida frecuentemente a alto porcentaje de terpenos presentes en el aceite (Elexson et al., 2013; Leonard et al., 2010). De manera que, estos terpenos han demostrado que pueden afectar estructuras de los agregados bacterianos haciéndolos más susceptibles a otros tratamientos (Iannitelli et al., 2011). Sin embargo, destaca que las concentraciones requeridas para la erradicación de biopelículas son relativamente altas comparadas contra desinfectantes comerciales; además, el efecto del AEC sólo ha sido evaluado contra *S. Typhimurium* en estado planctónico.

Los métodos utilizados para erradicar la matriz de la biopelícula en superficies de contacto son importantes para el aseguramiento de la inocuidad en la industria de alimentos. Considerando que una desinfección deficiente favorece la persistencia bacteriana en las biopelículas (Van Houdt y Michiels, 2010). Es por esto, que se requieren nuevas estrategias de control, una alternativa puede ser la combinación de distintos métodos, lo que es conocido como tecnología de barreras (Simões et al., 2006). La irradiación UV-C ha mostrado tener buen

efecto de erradicación contra biopelículas de *S. Typhimurium*, ya que presenta algunas ventajas sobre otros métodos, como una fácil aplicación, daño material genético afectando su replicación, entre otros (Mansor et al., 2014). Sin embargo, cuenta con limitantes como su efectividad superficial y su capacidad de inactivarse cuando es absorbida por ciertas biomoléculas presentes en el medio (Chun et al., 2010). De manera que, se podría proponer el uso de irradiación UV-C para combinarse con el AEC para el control de biopelículas de este patógeno. Por lo tanto, en el presente estudio, se evaluó el uso de AEC como potenciador de la irradiación UV-C en la erradicación biopelículas de *S. Typhimurium* formadas sobre superficies de acero inoxidable (304).

II. ANTECEDENTES

2.1. Formación de Biopelículas de *S. Typhimurium*

La formación y el desarrollo de biopelículas de *S. Typhimurium* están influenciados por muchos factores, incluyendo características de los materiales de la superficie y los parámetros ambientales tales como el pH, los niveles de nutrientes y temperatura (Srey et al., 2013). Estos consorcios estructurados tienen distintas funciones, como retención de agua, acumulación de nutrientes, intercambio de información genética, barrera protectora, facilita la adhesión a las superficies y la formación de agregados (Flemming y Wingender, 2010). La formación de biopelículas es un proceso que está constituido por cuatro etapas secuenciales; adhesión inicial, adhesión irreversible, maduración y dispersión (Figura 1).

2.1.1. Adhesión Inicial

La adhesión bacteriana a la superficie constituye el primer paso esencial de la formación de biopelículas (Renner y Weibel, 2011). Por lo que, la adhesión de células durante este proceso depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular bacteriana (Ferreira et al., 2010). Asimismo, la adhesión a superficies abióticas también se ve influida por el entorno que rodea a las células bacterianas, tales como la temperatura, la materia orgánica y el pH. Por lo tanto, estos factores pueden cambiar las pro-

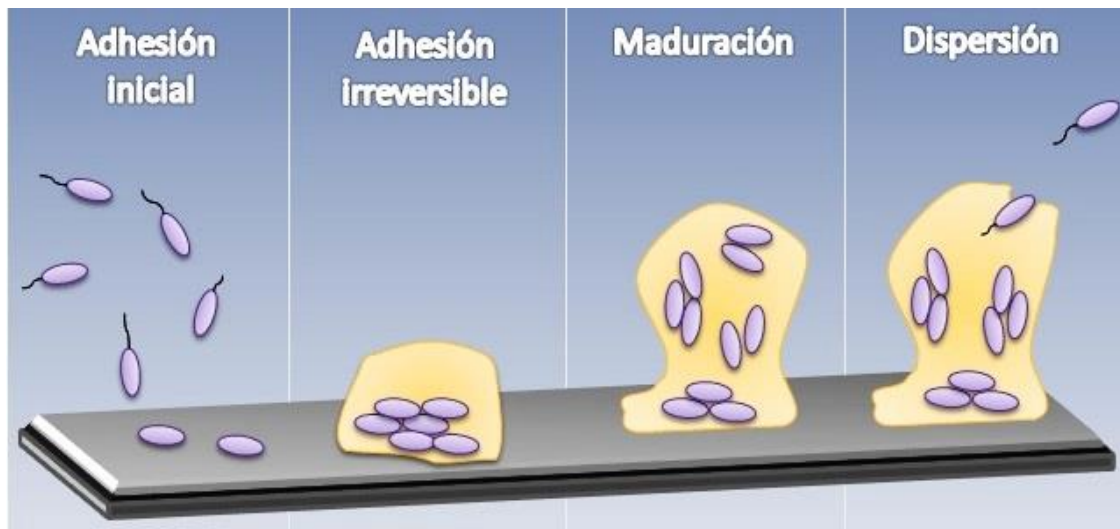


Figura 1. Representación de la formación de biopelícula bacteriana. Se observan las 4 etapas de desarrollo de una biopelícula: 1) adhesión inicial, 2) adhesión irreversible, 3) maduración, 4) dispersión.

propiedades de superficie bacteriana, sustrato y la capacidad de las bacterias para adherirse a superficies (Abdallah et al., 2014).

En general, cualquier superficie puede estar sujeta a la formación de biopelículas, principalmente materiales utilizados en la elaboración de alimentos, tales como acero, aluminio, nylon, teflón, caucho, plástico, vidrio, entre otros (Sofos, 2009). Por otra parte, las propiedades físico-químicas de las superficies que pueden afectar la adhesión son la textura, la carga superficial y la hidrofobicidad (Abdallah et al., 2009; Donlan, 2002). Sin embargo, si se encuentran SPE pre-existentes facilitarían la adhesión, por lo que procesos eficaces de desinfección en esta etapa son de suma importancia para poder controlarlas.

2.1.2. Adhesión Irreversible

El segundo paso en la formación de biopelículas es la adhesión irreversible, la cual está influida por la presencia de estructuras superficiales tales como fimbrias (Beloin et al., 2008). Después de la adhesión inicial, las células comienzan a replicarse en microcolonias, convirtiendo a la adhesión reversible en irreversible principalmente a través de la secreción de SPE que forman la matriz de la biopelícula. De manera que, las SPE están constituidas de una mezcla de compuestos poliméricos tales como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Flemming y Wingender, 2010). La producción de SPE ayuda a fortalecer el vínculo entre las bacterias y el sustrato y estabiliza la colonia de cualquier tipo de estrés ambiental (Ghafoor et al., 2011). Asimismo, las microcolonias pueden resultar muy beneficiadas ya que proporcionan intercambio de sustratos (Chmielewski y Frank, 2003).

Además, después de la unión irreversible, se necesita de una mayor fuerza de corte o la rotura química de las fuerzas de unión por enzimas, detergentes, desinfectantes y/o calor para la eliminación de la biopelícula (Srey et al., 2013).

Por lo que, es ahora cada vez más claro que la formación de una biopelícula está bajo el control de varias señales ambientales tales como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Karatan y Watnick, 2009). Del mismo modo, las bacterias pueden detectar estas señales ambientales y activar las redes de regulación con el fin de modular la formación de biopelículas.

2.1.3. Maduración

El tercer paso en la formación de biopelículas es la maduración, en esta etapa la biopelícula adopta una estructura tridimensional (Stoodley et al., 2002). Igualmente, este crecimiento se debe principalmente a las interacciones bacteria-bacteria; varias proteínas superficiales y componentes de la matriz extracelular que están implicadas en la adhesión bacteriana y la arquitectura de la biopelícula (Beloïn et al., 2008). Además, esta comunicación célula-célula, denominada convencionalmente *quorum sensing*, beneficia a la bacteria al permitirle sentir la presencia de microorganismos vecinos y responder a eventuales condiciones ambientales (Li y Tian, 2012). El proceso *quorum sensing* funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal indicando su presencia, de tal manera que mientras más bacterias se unen, se incrementa la concentración de esta señal (Heilmann y Götz, 2010).

Conforme aumenta el número de bacterias adheridas a la superficie, se incrementa la concentración de las moléculas de señalización, lo que induce cambios fenotípicos en las bacterias que resultan de la expresión de genes (Heilmann y Götz, 2010). De manera que, para coordinar la expresión de genes, las bacterias utilizan estos procesos de comunicación, produciendo y secretando moléculas señal llamadas autoinductores (Vogeleer et al., 2014). De ahí que, las principales moléculas empleadas para comunicarse entre bacterias Gram (-) son las acil homoserina lactonas (Heilmann y Götz, 2010; Stacy et al.,

2013). Por lo tanto, los dos factores más importantes para esta etapa son las autoinductoras para las interacciones célula-célula y SPE para la arquitectura de la matriz.

2.1.4. Dispersión

La última fase del ciclo de vida de la biopelícula es la dispersión, lo que representa una opción de las células para contaminar otras superficies, y luego repetir el ciclo (Abdallah et al., 2014). De manera que, la dispersión es un proceso complejo que implica varias señales y es utilizado por todas las especies bacterianas. Es decir, las bacterias generalmente cambian de un estilo de vida planctónica a biopelícula mediante la detección de los cambios ambientales (Kaplan, 2010). La dispersión es el resultado de varios eventos ambientales, tales como alteraciones en la disponibilidad de nutrientes, el agotamiento del oxígeno, y otras condiciones de estrés, que promueven la expresión de genes implicados en la dispersión (McDougald et al., 2011). También, procesos de biopelícula internos, como la degradación enzimática endógena, o la liberación de SPE o proteínas de unión de superficie, son todas las causas posibles de dispersión de biopelículas (Kaplan et al., 2004).

2.2. Impacto de las Biopelículas de *S. Typhimurium* en la Industria Alimentaria

Las enfermedades transmitidas por alimentos son uno de los grandes problemas a nivel mundial, estas enfermedades son causadas por la presencia de bacterias patógenas que son el principal punto a combatir en la industria alimentaria. Las biopelículas formadas en entornos de procesamiento de alimentos son de especial importancia, ya que se ha comprobado el potencial que éstas tienen de actuar como una fuente de contaminación bacteriana más

persistente. Por esta razón, pueden conducir a la descomposición de los alimentos o la transmisión de enfermedades (Van Houdt y Michiels, 2010). Se han presentado en una amplia gama de industrias de alimentación como la cervecera, procesamiento de mariscos, elaboración de productos lácteos, el procesamiento de aves de corral y procesamiento de carne (Chmielewski y Frank, 2003; Flemming y Ridgway, 2008; Harvey et al., 2007; Shikongo-Nambabi et al., 2011; Sofos y Geornaras, 2010).

S. Typhimurium es uno de los patógenos transmitidos por los alimentos más importantes clínicamente y se han reportado varios brotes por consumo de alimentos, contaminados por esta bacteria (Cuadro 1) (CDC, 2013). En el 2013 se reportó un brote causado por contacto de *S. Typhimurium* en laboratorios de universidades de microbiología en los Estados Unidos de América, en este caso se reportaron 41 personas infectadas de las cuales resultaron 15 hospitalizadas (CDC, 2014). En el 2012 se reportó un brote por melón Cantaloupe donde 461 personas fueron infectadas por este patógeno y 94 resultaron hospitalizadas y 3 de éstas murieron. Además, para el tratamiento de esta enfermedad se estiman alrededor de \$ 365 millones USD al año en costos médicos directos en EEUU (CDC, 2015). Por otro lado, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria reportó más de 100,000 casos humanos de la enfermedad debido a *Salmonella* sp., con un costo aproximado de 3 mil millones de euros anuales (EFSA, 2015). Estos reportes indican la habilidad que tiene *S. Typhimurium* de causar problemas para la industria alimentaria y las consecuencias que esto puede traer, lo que representa la necesidad de controlar este patógeno.

Cuadro 1. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con *S. Typhimurium*.

Brote	Consecuencias
Infecciones relacionadas con clínicas y laboratorios de enseñanza de microbiología (2013)	41 personas infectadas y 15 hospitalizadas
Aves de corral (2013)	356 personas infectadas y 62 hospitalizadas
Carne molida (2013)	22 personas infectadas y 7 hospitalizadas
Melón Cantaloupe (2012)	261 personas infectadas, 94 hospitalizadas y 3 muertas

Fuente: CDC, 2016

2.3. Control de Biopelículas

Para erradicar biopelículas de *S. Typhimurium* que se encuentran en las superficies de contacto con alimentos, se requieren de procesos de limpieza y desinfección, por ejemplo, mediante métodos físicos y químicos los cuales han sido utilizados ampliamente (Giaouris et al., 2014). También, se establece que bacterias adheridas a las superficies son más resistentes a estos procesos en comparación con las células en estado planctónico. Además, los métodos actuales de saneamiento en instalaciones de alimentos tienen algunos inconvenientes bien conocidos, tales como la posible toxicidad de los residuos de agentes de desinfección o la promoción de la resistencia a estos agentes en los microorganismos transmitidos por los alimentos (Moen et al., 2012).

El objetivo principal de un proceso de limpieza es la eliminación de residuos del producto. Puesto que, indirectamente la eliminación de estos residuos es también un primer punto crítico en la eliminación y el control de biopelículas. Asimismo, los métodos adecuados para eliminar los residuos en superficies de contactos, así como matriz de la biopelícula ya existente son importantes para la industria de procesamiento de alimentos. Ya que, la eliminación incompleta facilitaría la reinscripción de las bacterias a la superficie y la formación de una nueva biopelícula aun cuando las bacterias de la biopelícula anterior murieran en el proceso de limpieza (Van Houdt y Michiels, 2010). De manera que, los métodos utilizados en muchas industrias de procesamiento de alimentos, son sólo adecuados en la eliminación de biopelículas cuando los parámetros del proceso son correctos: es decir, formulaciones adecuadas, concentraciones, tiempo, temperatura y energía cinética (flujo) (Antoniouand y Frank, 2005). A continuación, se presentan algunos de los métodos que se están estudiando:

2.3.1. Agentes Químicos

Los agentes químicos siguen siendo el modo más común de inactivación bacteriana por razones de costo y practicidad (Cuadro 2). Sin embargo, existen numerosos factores que determinan su eficacia, tales como tiempo de contacto, el medio ambiente y la concentración del desinfectante. Además, ahora se reconoce que los estudios de células planctónicas no reflejan la eficacia de los desinfectantes contra bacterias en forma de biopelículas y muchos desinfectantes son menos eficaces contra las biopelículas (Wong et al., 2010). Sin embargo, el uso de desinfectantes va en decremento debido a la mala percepción que tienen los consumidores hacia estos, además de que las bacterias pueden generar resistencia. A continuación se describen algunos agentes químicos de desinfección que más se utilizan en la industria alimentaria.

Hipoclorito de sodio. El hipoclorito de sodio (NaOCl) ha sido ampliamente usado como un potente agente antimicrobiano y a pesar de algunas propiedades deseables incluyendo la disponibilidad y bajo costo, tiene algunos inconvenientes. Puesto que, debido a su potencial de oxidación, su aplicación frecuente a ciertas superficies puede causar la corrosión (Krug et al., 2012). Por otro lado, muchos investigadores han informado que es un desinfectante eficaz para la inactivación de biopelículas (Nguyen y Yuk, 2013; Tyagi et al., 2013; Vaid et al., 2010). En cierto modo, esta eficacia se podría ver más favorecida en entornos de pH ácido que en lugar de pH alcalino (Araújo et al., 2011). En un estudio se evaluó el efecto del hipoclorito de sodio contra biopelículas de *S. Typhimurium* donde se probaron distintas concentraciones. La concentración que tuvo mejor efecto al erradicar por completo las biopelículas fue de 1.31 g/L (Wong et al., 2010).

Cuadro 2. Agentes químicos para controlar biopelículas bacterianas.

Agente químico	Concentración	Reducción	Referencia
Peróxido de hidrógeno	0.23 %	7 a 3 log UFC/mL para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rushdy y Othman 2011
Peróxido de hidrógeno	0.2%.	Reducción total log UFC/cm ² <i>Vibrio spp.</i>	Shikongo-Nambabi, Kachigunda et al., 2010
Hipoclorito de sodio	50 ppm	Reducción total log UFC/cm ² S. Typhimurium	Nguyen y Yuk, 2013
Hipoclorito de sodio	1.31 g/L	Reducción total log UFC/mL S. Typhimurium	Wong et al., 2010
Ácido peracético	0.1%	8 a 2 log UFC/cm ² S. Typhimurium	Nguyen y Yuk, 2013
Cloro	100 ppm	6 log UFC/cm ² S. Typhimurium	Joseph et al., 2001

En otro estudio realizado por Nguyen y Yuk (2013) se evaluó el efecto de distintos agentes químicos, como el hipoclorito de sodio sobre biopelículas de *S. Typhimurium*. La concentración de este sanitizante en la que se logró eliminar por completo la biopelícula fue de 50 ppm. Por lo que, acorde a estos estudios, puede ser sugerido el uso de soluciones de hipoclorito de sodio para erradicar y remover biopelículas.

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno se está utilizando cada vez más para la desinfección en campos médicos, industrias de alimentos y aplicaciones industriales, pero también en los ambientales, tales como el tratamiento de aguas. Asimismo, se ha demostrado la eficacia como parte de las formulaciones líquidas y en forma de vapor contra bacterias, esporas, virus y hongos (Linley et al., 2012; Rutala et al., 2012). Shikongo-Nambabi et al. (2010) utilizaron H_2O_2 contra cuatro cepas de *Vibrio* spp. en agua de mar, donde se encontró ser muy eficaz en la inhibición y erradicación de biopelículas. De manera que, se inhibió a una concentración de 0.05% (500 mg/L) y erradicó biopelículas maduras a concentraciones entre 0.08% y 0.2%. Además, se postula que los diferentes iones minerales presentes en el agua de mar son esenciales en la mejora de la reacción del H_2O_2 contra microorganismo (Shikongo-Nambabi et al., 2010).

Rushdy y Othman (2011) determinaron la eficacia de 8 desinfectantes sobre biopelículas de *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (bacterias Gram-positivo), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. typhi* (bacterias Gram-negativo) formadas en acero inoxidable. De manera que, la investigación reveló que el más efectivo de todos los desinfectantes probados fue H_2O_2 (0.23 % a 3.75%), ya que eliminó todas las células bacterianas viables en las biopelículas bacterianas. Además, en otro estudio se determinó que las biopelículas de 3 bacterias Gram-negativa podrían ser erradicadas con distintos desinfectantes basados en peróxido de hidrógeno (Perumal et al., 2014). Sin embargo, se demostró que estas no fueron susceptibles a las concentraciones utilizadas. Por

lo cual, esto puede comprometer la capacidad de erradicar biopelículas de estos patógenos con tales productos.

Ácido peracético. El ácido peracético es el perácido más popular debido a que se sintetiza fácilmente y es ambientalmente benigno. Asimismo, es un bactericida muy eficaz para la desinfección sobre un amplio rango de pH y temperatura. Recientemente, el uso de ácido peracético como un agente de desinfección benigno ha atraído interés hacia el medio ambiente, en la industria alimentaria, en la industria de la salud y en el tratamiento de aguas residuales. Puesto que, el uso de ácido peracético no conduce a la formación de subproductos de desinfección que puede causar peligros para la salud (Choi et al., 2015). Nguyen y Yuk (2013) probaron el efecto de ácido peracético sobre biopelículas de *S. Typhimurium*. En este estudio se vio una reducción de hasta 6 log/UFC con una concentración de 0.1% de ácido peracético. Por lo que, este agente químico demostró ser efectivo contra las biopelículas de *S. Typhimurium* y se podría tomar en cuenta para controlarlas en la industria alimentaria.

El ácido peracético es eficaz contra biopelículas de *P. aeruginosa* formadas sobre superficies de poliestireno, inhibiendo casi el 100% de la población microbiana (Martín-Espada et al., 2014). Además, la relación de concentración-efectividad obtenida en este estudio pone de manifiesto un alto nivel de seguridad en su acción desinfectante, ya que incluso en la mitad de la concentración recomendada mantiene un nivel significativo de la eficacia en este tipo de biopelícula. Sin embargo, aunque estos agentes químicos demuestren efectos positivos contra las biopelículas; existen otros factores como el rechazo del consumidor hacia estos y el deterioro que pueden causar a los equipos, que juegan un papel muy importante a la hora de considerarlos para controlar este problema.

Cloro. Es uno de los desinfectantes más utilizados, práctico y efectivo para la desinfección de microorganismos patogénicos y se puede aplicar de manera individual o después del uso de otros agentes durante el proceso de limpieza. Previamente, se encontró que un tratamiento con cloro durante 15 min (100 ppm) erradica por completo biopelículas de *Salmonella sp* formadas en superficies de acero inoxidable., mientras que 50 ppm no erradicó las biopelículas incluso después de 25 min (Joseph et al., 2001).

En otro estudio por Schlisselberg y Yaron (2013), con tratamientos de 50 ppm de cloro lograron reducir 2.21 y 4.78 log/UFC cm² de biopelículas de *S. Enteritidis* formadas en cupones de acero inoxidable a temperatura de 25 y 4 °C, respectivamente. Por lo que, esto nos demuestra la eficacia que pueden tener los sanitizantes, pero que muchos factores tales como la temperatura, pH y tiempo de exposición pueden afectar su efecto contra las biopelículas al incrementar la resistencia a estos tipo de agentes químicos.

2.3.2. Aceite Esencial de Clavo como Antibacteriano Natural

El aceite esencial de clavo posee propiedades antibacterianas y se ha proyectado como fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos y agentes que promuevan la conservación de los alimentos (Solorzano-Santos y Miranda-Novales, 2012). Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de partes de plantas (flores, hierbas, brotes, hojas, frutos, ramas, corteza, semillas, madera y raíces). El porcentaje de los componentes de aceites esenciales varía entre especies y partes de la planta; principalmente son monoterpenos, sesquiterpenos, y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, fenoles y óxidos) (Alviano y Alviano, 2009). Por lo que, se le atribuyen estas actividades antibacterianas principalmente a sus compuestos mayoritarios o la acción sinérgica que existe entre ellos.

El principal modo de acción de los aceites esenciales es la desestabilización de la membrana celular (Figura 2). Los aceites esenciales son de naturaleza lipofílica y, por tanto, fácilmente permeables a través de la pared celular y la membrana celular. Interacciones de los aceites esenciales y sus componentes con polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos hacen las membranas bacterianas más permeables, de modo que la pérdida de iones y contenido celular conduce a la muerte bacteriana (Saad et al., 2013). Del mismo modo, la interferencia en la actividad de la bomba de protones, la pérdida de integridad de la membrana y la filtración de los contenidos celulares puede resultar en la pérdida de viabilidad. Otros mecanismos de acción importantes incluyen, la desnaturalización de las proteínas citoplasmáticas y la inactivación de las enzimas celulares que conducen a la muerte celular bacteriana (Raut y Karuppayil, 2014). Estos mecanismos propuestos son basados en la presencia de bacterias en estado planctónico, sin embargo, hoy en día conocemos los mecanismos de resistencia que adoptan las bacterias al formar biopelícula. En este punto, existe muy poca información acerca de la capacidad de los aceites esenciales para la erradicación de biopelículas bacterianas y sobre todo en el posible mecanismo de acción de estos agentes en las distintas etapas de formación de la biopelícula.

El AEC también ha demostrado tener alto potencial contra bacterias patógenas y este potencial es atribuido a los compuestos que lo componen, donde se ha reportado principalmente el eugenol como componente mayoritario y en menor medida otro tipo de compuestos como cariofileno (Chaieb et al., 2007). En un estudio por Kavanaugh y Ribbeck (2012) determinaron la concentración mínima de erradicación de biopelículas (CMEB) de *S. aureus* con distintos aceites esenciales. En particular, la CMEB del AEC fue de 18000 ppm sobre biopelículas de *S. aureus*. Por otro lado, Chamdit y Siripermpool (2012) también determinaron la CMEB de AEC sobre *S. aureus*. Sin embargo, en este estudio la concentración fue de 50000 ppm, lo que indica que otros factores como el tiempo de exposición, composición del aceite y concentraciones utilizadas también pueden influir en la eficacia de estos tratamientos. El efecto del AEC

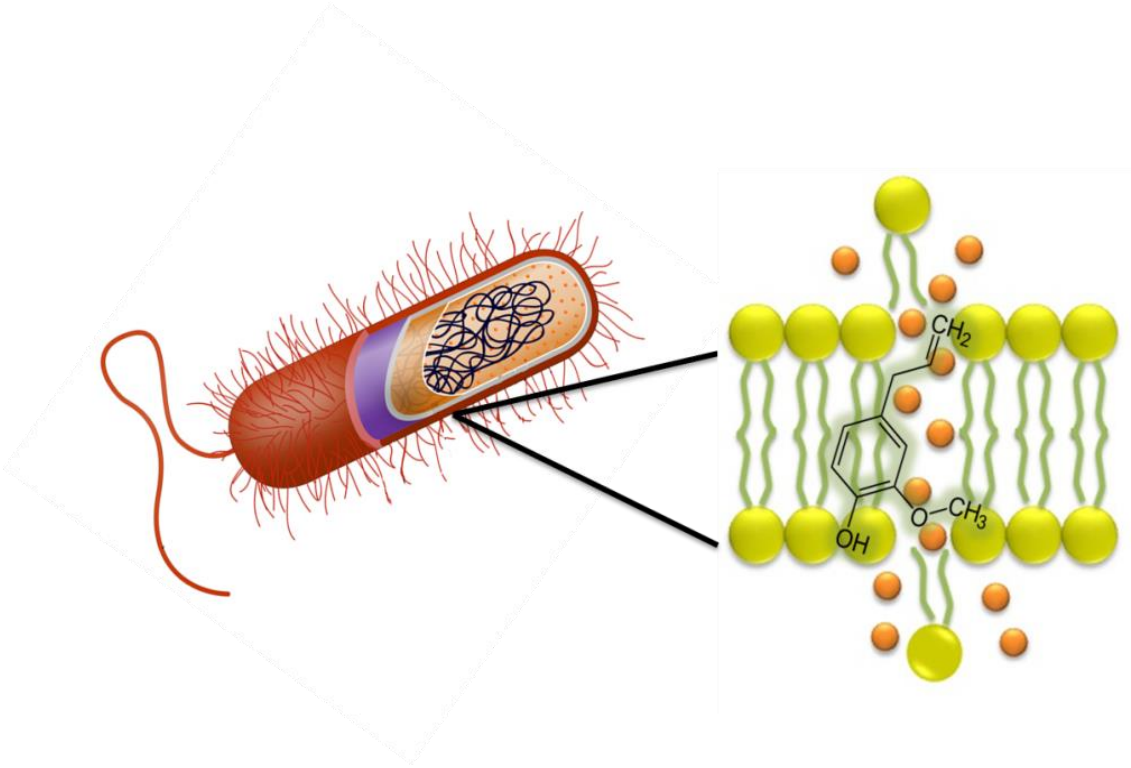


Figura 2. Interacciones entre eugenol (componente mayoritario del AEC) y la membrana celular bacteriana, provocando pérdida de contenido celular.

sobre biopelículas de *Vibrio parahaemolyticus* fue probado en una investigación, donde mostró reducir hasta un 90% con una concentración de 62500 ppm. Por lo que, estos reportes indican la eficacia que puede llegar a tener el AEC contra diferentes biopelículas bacterianas a pesar de que no ha sido reportada evidencia de su aplicación contra *S. Typhimurium*.

En un estudio realizado por Iannitelli et al. (2011) se evaluó el efecto de carvacrol en la viscosidad de biopelículas de *S. epidermidis*: este mostró una reducción significativa en los valores de la viscosidad de flujo estable cuando se comparó con biopelículas sin carvacrol. Por lo que, este hallazgo permite especular un posible papel del carvacrol sobre modificaciones estructurales en la matriz de SPE de biopelículas bacterianas, lo cual, corresponde a una fluidificación de la matriz que podría potenciar la penetración de los agentes antimicrobianos en el núcleo de la biopelícula, donde se encuentran las células persistentes.

Por lo anterior, la creciente percepción negativa de los consumidores contra los productos químicos sintéticos, ha propiciado al desarrollo de alternativas, desinfectantes ecológicos, que los consumidores perciban como "naturales". Además, es probable que sea más difícil para las bacterias desarrollar resistencia a los aceites esenciales, ya que cuentan con múltiples componentes comparados con los antibióticos comunes que a menudo están compuestos de una única entidad molecular. Sin embargo, también hay que señalar que las concentraciones requeridas para el control de las bacterias son muy altas, por lo que se podría sugerir combinar dosis más bajas con otros tratamientos.

2.3.3. Irradiación UV-C en el Control de Biopelículas Bacterianas

La radiación ultravioleta (UV) tiene numerosas ventajas sobre varios métodos de desinfección existentes. La longitud de onda de los rayos ultravioleta (UV) varía entre 100-400 nm, mientras que la radiación UV-C cae en el rango de

200-280 nm. La UV-C es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, algas, protozoos, levaduras y mohos mediante la interrupción de su replicación del ADN (Mansor et al., 2014). Actualmente, la tecnología de irradiación UV se utiliza como una alternativa a la esterilización química en productos alimenticios y ha sido aprobado por la FDA para control de microorganismos superficiales (Cuadro 3) (Chun et al., 2010; De Souza y Fernández, 2011). Por lo tanto, la radiación no tiene restricciones legales o requiere un amplio equipamiento de seguridad para utilizarse y estas características lo convierten en un método de desinfección interesante para el procesamiento de alimentos.

Se ha visto que la radiación UV-C (390 mJ/cm^2) es más eficaz que otros métodos de control tales como cloro (200 ppm), ácidos cítrico, málico y láctico al 2%, ultrasonicación y plasma (750 mJ/cm^2) contra biopelículas de *Listeria monocytogenes* formadas en lechuga y repollo (Srey et al., 2014). Esto debido a que reducen la supervivencia de patógenos independientemente de la adhesión, mientras que los tratamientos químicos se basan fuertemente en la difusión de sustancias dentro de la matriz de la biopelícula, así como en su penetración a las células bacterianas. Sin embargo, también se ha demostrado que este efecto superficial se puede ver debilitado por la formación de biopelículas. Ya que, se ha demostrado que a mayor tiempo de desarrollo los agregados bacterianos presentarán mayor resistencia a irradiación UV-C. Células de *L. monocytogenes* embebidas en biopelículas formadas en acero inoxidable durante 7 días mostraron mayor resistencia a la irradiación en comparación con las bacterias adheridas por 1 h antes de la exposición de UV-C. No se sabe si esto es debido a los cambios fisiológicos ocurridos durante los 7 días del desarrollo de la biopelícula. Por ejemplo, el desarrollo de compuestos extracelulares o una protección física de las células en la matriz alimentaria o una combinación de estos factores podrían ser los responsable de la resistencia a este tratamiento (Bernbom et al., 2011).

Cuadro 3. Efecto de la irradiación ultravioleta sobre la erradicación de biopelículas bacterianas.

Irradiación	Reducción	Referencia
72 mJ/cm ²	6.5 log <i>S. Typhimurium</i>	Jahid et al., 2014
390 mJ/cm ²	4 log <i>L. monocytogenes</i>	Srey et al., 2014
254 nm 6 min	5.19 log <i>L. monocytogenes</i>	Bernbom et al., 2011

Basados en esta evidencia se resaltan las ventajas y desventajas de cada método de desinfección utilizado para la erradicación de biopelículas, y la necesidad de la utilización de tecnologías de barrera.

2.3.4. Tecnologías de Barrera

El principio de la exposición de los microorganismos a más de un factor de estrés ambiental simultáneamente con el propósito de inhibir el crecimiento y que se utiliza comúnmente en la industria alimentaria, se conoce como “tecnología de barreras”. Actualmente, la tecnología de barreras combina deliberadamente una serie de factores (barreras) que los microorganismos en cuestión son incapaces de superar. De manera que, mientras son expuestos a estas barreras, los microorganismos tratan de adaptarse a los cambios ambientales (Waal et al., 2012). Por lo que, cada adaptación a estos factores, les demanda un gasto de energía y por esta razón, los microorganismos se ven afectados al tener más de una barrera que superar.

El efecto de combinar tratamientos de H₂O₂ (50 ppm) y UV-C (254 nm) en biopelículas ha demostrado ser más eficaz que el sólo uso de H₂O₂, lo que podría contribuir a un tratamiento más eficaz y mejor para el medioambiente (Vankerckhoven et al., 2011). En este estudio, el efecto de reducción individual del H₂O₂ fue de 1.7 log UFC/cm² y el de la irradiación fue 1.2 log UFC/cm², mientras que al combinar estos tratamientos contra bacterias en estado planctónico se observó un efecto sinérgico con una reducción de 3.2 log UFC/cm². Por otra parte, al combinar estos tratamientos sobre biopelículas se observó un efecto aditivo al reducir 2.9 log, esta reducción del efecto podría ser en gran medida a la matriz de SPE que le confiere resistencia a las bacterias. La ultrasonificación de baja frecuencia (20-20 kHz) fue investigada sobre biopelículas de *P. aeruginosa*. De ahí que, el efecto de las vibraciones de baja frecuencia en combinación con tobramicina (5 µg/mL) fueron eficaces en la

eliminación de biopelículas (Bandara et al., 2014). Sin embargo muchos de estos estudios no son dirigidos hacia biopelículas formadas por *S. Typhimurium*, además de que no se ha reportado la combinación de métodos físicos con antimicrobianos naturales, lo cual podría llegar a ser una alternativa promisoría para el control de biopelículas. Por lo anterior, el presente estudio plantea que la combinación de AEC con irradiación UV-C, favorece la erradicación de biopelículas de *S. Typhimurium*, debido a que el aceite afecta la estructura y morfología del agregado bacteriano incrementando el efecto de la irradiación.

III. HIPOTESIS

La combinación de aceite esencial de clavo con irradiación UV-C, favorecen sinérgicamente la erradicación de biopelículas de *Salmonella* Typhimurium, afectando la estructura, viabilidad celular y morfología del agregado bacteriano.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la combinación de aceite esencial de clavo con irradiación UV-C sobre la estructura, morfología y viabilidad celular en biopelículas de *Salmonella* Typhimurium.

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar la composición de volátiles en el aceite esencial de clavo.
- Determinar el efecto del aceite esencial de clavo sobre la estructura, morfología y viabilidad celular en biopelículas de *Salmonella* Typhimurium.
- Evaluar el efecto de la irradiación UV-C sobre la viabilidad celular, estructura y morfología en biopelículas de *Salmonella* Typhimurium.
- Determinar el efecto sinérgico de la aplicación de aceite esencial de clavo e irradiación UV-C, sobre la viabilidad celular, estructura y morfología en biopelículas de *Salmonella* Typhimurium

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Identificación de Compuestos Volátiles del AEC

El aceite esencial de clavo fue adquirido en Sigma-Aldrich (W232300 Toluca, México). La identificación de los compuestos volátiles del AEC se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases (Varian GC-3400 Cx, México) equipado con un detector de masas, Saturn 2100T (Varian, México). Se utilizó una columna capilar DB-5 (30m x 0.25mm) con incremento de temperatura de 65 a 290°C a una tasa de 1°C/min, mantenida 3 min. Posteriormente, la temperatura se aumentó a una tasa de 10°C/min, mantenida 3 min usando helio como gas acarreador y un flujo de 1mL/min. Para la detección, se utilizó un sistema de ionización de electrones con una energía de ionización de 70 eV. Las temperaturas del inyector y transferencia MS fueron 100 y 290°C respectivamente. La identificación de los constituyentes se basó en la comparación de los espectros de masas de estos contra los encontrados en la base de datos de sistema CGMS NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, Maryland, EUA).

5.2. Determinación de CMI y CMB de AEC y Eugenol contra Células Planctónicas

Eugenol fue adquirido en Sigma-Aldrich (W246719 Toluca, México). *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 se cultivó en caldo Mueller Hinton y se incubó a 37°C durante 24 h. Después de la incubación, una dilución de cien veces del cultivo que corresponde con el estándar de turbidez McFarland 0.1 (aproximadamente 10^6 UFC/mL) se utilizó para los procedimientos experimentales. La determinación de CMI y CMB de AEC se realizó mediante el ensayo de microdilución en caldo por Chamdit y Siripermpool (2012). Diluciones seriadas de aceite de clavo y eugenol (0.0 mg/mL a 2.5 mg/mL) en caldo Mueller Hinton + 5% de DMSO se prepararon en 96 pocillos de fondo plano de placas de microtitulación (Cellstar, Greiner Bio-One). 5 μ L de inóculo y 295 μ L de AEC se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 24 h. La CMI (mg/mL) se determinó como la concentración más baja de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento visible de la bacteria. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Por otra parte, 20 μ L de las diluciones se inocularon en agar Mueller Hinton y se incubaron a 37°C durante 24 h. La CMB se determinó a partir de la concentración más baja de aceite esencial que inhibe totalmente el crecimiento.

5.3. Formación de Biopelículas de *S. Typhimurium* en Superficies de Acero Inoxidable

La formación de biopelículas de *S. Typhimurium* en superficies de acero inoxidable se llevó a cabo mediante el método descrito por Jadhav et al. (2013) con algunas modificaciones. Previamente los cupones de acero inoxidable (1.0 x 1.0 x 0.1 cm) se colocaron en acetona y se sometieron a un baño de ultrasonido durante 30 min. Después se lavaron con agua destilada y se

secaron a 50°C durante 30 min en estufa. Por último, se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 min.

En condiciones estériles, los cupones de acero inoxidable se colocaron en tubos de ensayo con caldo Mueller Hinton. Enseguida se agregó la suspensión bacteriana para obtener una concentración final de 1×10^8 UFC/mL. El inóculo se preparó a partir de un cultivo en fase exponencial (18 h en caldo Mueller Hinton) ajustando su densidad óptica (a 600 nm) a 0.1 unidades, lo que equivale a 0.5 unidades en la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Los tubos de ensayo con los cupones se incubaron durante 24, 48, 72 y 144 h a 37°C.

5.4. Efecto del AEC sobre Biopelículas de *S. Typhimurium* Formadas en Superficies de Acero Inoxidable

Las biopelículas formadas fueron expuestas durante 1 h a las concentraciones de 0.6, 1.2 y 1.8 mg/mL de AEC diluidas en 5 mL de solución salina. Consecutivamente, se hizo el conteo de células adheridas al cupón como posteriormente se describe (de Oliveira et al., 2010).

5.5. Efecto de la Irradiación UV-C sobre Biopelículas de *S. Typhimurium* Formadas en Superficies de Acero Inoxidable

Para el tratamiento UV-C, ambos lados de los cupones con las biopelículas formadas se irradiaron con diferentes dosis (39.52, 76.41, 149.26, 372.1 y 620.4 mJ/cm^2). La irradiación se realizó con el emisor UV-C modelo STERIL GTD-AIR 16 "(lámpara UV de baja presión de 200 a 260 nm,) se suspendió horizontalmente 15 cm por encima de los cupones (Jahid et al., 2014). Las dosis de radiación se determinaron con el fotoradiómetro, HD2102.1, Delta.

Posteriormente, para ver el resultado de esto se procedió al conteo de las células adheridas al cupón.

5.6. Efecto del Aceite Esencial de Clavo e Irradiación UV-C sobre Biopelículas *S. Typhimurium* Formadas en Superficies de Acero Inoxidable

Para el efecto de la combinación del aceite esencial y la irradiación UV-C, las biopelículas fueron formadas en los cupones de acero inoxidable y expuestas a 3 diferentes concentraciones de AEC (0.3, 0.6 y 1.2 mg/mL) que se determinaron en base a experimentos previos (Jadhav et al., 2013). Posteriormente, ambos lados de los cupones se irradiaron con 3 dosis (15.33, 39.52 y 76.41 mJ/cm²). Se utilizó una lámpara UV 15W (de baja presión con longitud de onda de 260 nm,). Finalmente, para ver el resultado de esto se procedió al conteo de las células adheridas al cupón.

5.7. Conteo de Células de *S. Typhimurium* Adheridas a Acero Inoxidable

Los cupones se retiraron y se lavaron con agua destilada estéril para remover las células no adheridas. Enseguida los cupones se colocaron en 3 mL de solución salina y se sometieron a un baño de ultrasonido durante 5 min con la finalidad de desprender las células adheridas. A partir de la suspensión bacteriana obtenida después de la sonicación, se realizaron diluciones seriadas para determinar el número de bacterias adheridas por unidad de área (log UFC/cm²) mediante conteo en placa en agar Mueller Hinton después de 24 h de incubación a 37°C (Jadhav et al., 2013).

5.8. Análisis por Microscopía Laser Confocal de Barrido

La microscopía laser confocal se utilizó para la identificación del estado bacterias (viables o muertas) de la biopelícula. Basados en el trabajo de Li et al. (2012), las biopelículas se tiñeron durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad con el kit de tinción que contiene SYTO 9 (ácidos nucleicos fluorescentes) y yoduro de propidio. SYTO 9 (excitación/emisión: 480/500 nm) que emite fluorescencia verde y se utilizó para identificar microorganismos que viables que viven con membrana intacta mientras que yoduro de propidio (excitación/emisión: 490/635 nm) emitió fluorescencia de color rojo y tiñó las bacterias muertas con la membrana dañada. Las células viables y muertas, por tanto, se pudieron identificar de forma simultánea.

5.9. Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica

Se utilizó microscopía de fuerza atómica (AFM) con el fin de evaluar los perfiles topográficos y cambios superficiales en la estructura de las biopelículas. A los cupones de acero inoxidable donde se formaron de manera previa las biopelículas, se les aplicaron los tratamientos de 1.8 mg/mL de AEC, 76.41 mJ/cm² UV-C y combinación AEC (0.6 mg/mL) y UV-C (39.52 mJ/cm²). Posteriormente, fueron examinados directamente por AFM. Se utilizó un microscopio XE-BIO AFM (Park System) en el modo de contacto verdadero para obtener imágenes topográficas, cada muestra fue analizada en campos de 20x20 µm. El programa de procesamiento de imágenes XE se utilizó para generar dimensión fractal y rugosidad promedio biopelículas de *S. Typhimurium* (Santacruz-Gomez et al., 2014).

5.10. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El presente estudio se dividió en tres etapas. Los diseños experimentales para cada una de estas fueron completamente al azar. La primera etapa consistió en determinar el efecto del aceite esencial de clavo sobre biopelículas de *S. Typhimurium* donde el factor fueron las concentraciones del aceite. En la segunda etapa se determinó el efecto de la irradiación UV-C sobre biopelículas de *S. Typhimurium* donde el factor fueron las dosis. Para la tercera etapa se evaluó el efecto del AEC e irradiación UV-C sobre biopelículas de *S. Typhimurium* donde los factores fueron la dosis de irradiación UV-C y las concentraciones del AEC. En las 3 etapas la variable de respuesta fueron las células de *S. Typhimurium* adheridas ($\log \text{UFC}/ \text{cm}^2$). Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para estimar diferencias ($P \leq 0.05$) y una prueba de comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer. Todo el análisis se realizó en el software estadístico NCSS (2007).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Etapa 1: Efecto del AEC Sobre Biopelículas de *S. Typhimurium*

6.1.1. Identificación de Compuestos Volátiles del AEC

Los componentes principales del AEC determinados fueron eugenol (82.58%), seguido de cariofileno (9.97%), isoeugenol (4.192%) y α -cariofileno (2.10%) (Figura 3). Además, en menor medida copaeno, benzaldehído, δ -cadineno, óxido de cariofileno (Cuadro 4). La composición del AEC es similar en comparación con otros estudios, Zengin y Baysal (2014) reportaron eugenol (75.2%), salicilato de bencilo (14.74%), propilenglicol (6.02%) y también beta-cariofileno (3.21%) siendo eugenol el componente principal del aceite esencial probado en este estudio. Por otra parte, el componente principal del AEC reportado fue eugenol (77.8%), cariofileno (12.2%) y cantidades menores de otros componentes tales como acetueugenol (4.9%) pero las proporciones varían ampliamente (Mazzarrino et al., 2015). Por ejemplo, Prashar et al. (2006) encontraron 78% de eugenol, con 13% β -cariofileno, mientras Pawar y Thaker (2006) encontraron que el contenido de eugenol fue de 47.64 %, la variación de la composición del AEC puede ser causada por la distribución geográfica, temporadas climáticas y condiciones del suelo. Por lo que, los componentes que están presentes en la mayoría de los estudios son eugenol, oxido de cariofileno y cariofileno, a los cuales pudiera ser atribuida la actividad biológica del AEC ya se por el efecto individual de cada compuesto o el efecto sinérgico de la combinación de ellos.

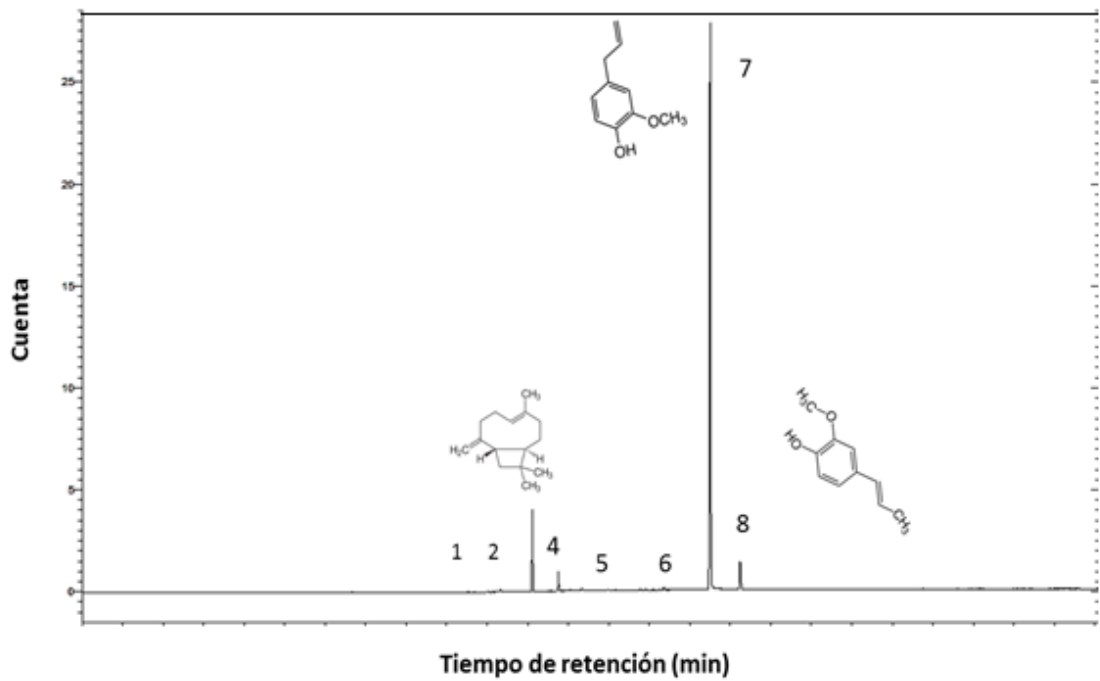


Figura 3. Perfil de volátiles de AEC. 1) Copaeno, 2) Benzaldehído, 3) Cariofileno, 4) α -Cariofileno, 5) δ -Cadineno, 6) Óxido de cariofileno 7) Eugenol, 8) Isoeugenol

Cuadro 4. Contenido de compuestos volátiles del AEC determinado por cromatografía de gases-masas.

Componentes	Porcentaje del total (%)
Copaeno	0.119
Benzaldehido	0.335
Cariofileno	9.971
α -Cariofileno	2.106
δ -Cadineno,	0.232
Oxido de cariofileno	0.459
Eugenol	82.586
(E)-Isoeugenol	4.192

6.1.2. Actividad Antibacteriana del AEC y Eugenol contra Células Planctónicas

Después de 24 h de incubación, la CMI y CMB del AEC contra *S. Typhimurium* fue de 0.4 y 0.6 mg/mL, respectivamente (Cuadro 5). De igual manera, se observa en el cuadro 5 que el eugenol mostró una CMI y CMB contra *S. Typhimurium* de 0.6 y 0.7 mg/mL respectivamente. La actividad antibacteriana del AEC y eugenol ha sido probada en otros estudios. Por ejemplo, Naveed et al. (2013b) reportan que 6 mg/mL fue la CMI de aceite esencial de clavo contra *S. Typhi* siendo mayor que la concentración usada en este estudio. En otro estudio realizado por Zengin y Baysal (2014), la CMI determinada fue de 10.6 mg/mL contra *S. Typhimurium*, la cual resultó más alta que la de este estudio. Por lo tanto, las diferencias entre los resultados de estos estudios pueden deberse a muchos factores, tales como la condición de cultivo de plantas, la cepa bacteriana, la naturaleza de aceite, parte del material vegetal, el método de extracción de aceite esencial, y el tipo de disolvente.

El principal mecanismo de acción hipotetizado para el AEC es la desestabilización de la membrana celular. Los aceites esenciales son de naturaleza lipofílica y, por tanto fácilmente permeable a través de la pared celular y la membrana celular. Interacciones de los aceites esenciales y sus componentes con polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos hacen que la membrana bacteriana sea más permeable, de modo que la pérdida de iones y contenido celular conduce a la muerte celular (Saad et al., 2013).

Nazer et al. (2005) reportaron que 0.52 mg/mL fue la CMI de eugenol contra *S. Typhimurium*, lo que representa resultados similares a los de nuestro estudio. Además, se podría inferir con estos resultados que la actividad del AEC sobre las bacterias se puede atribuir a los mecanismos no específicos de acción de este terpeno. En detalle, eugenol ejerce una permeabilización no específica de la membrana citoplasmática, determinando un aumento del potasio y ATP fuera

Cuadro 5. Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas del aceite esencia de clavo sobre *S. Typhimurium*.

	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
AEC	0.4	0.6
Eugenol	0.6	0.7

de las células, inhibiendo así la actividad de las enzimas esenciales (Hyldgaard et al., 2012).

6.1.3. Formación de Biopelículas de *S. Typhimurium*

Para evaluar el cambio en el número de bacterias adheridas a los cupones de acero inoxidable, se formaron biopelículas con tiempos de incubación desde 0 hasta 144 h a 37°C (Figura 4). A partir de un inóculo de 10^8 log UFC/mL, a las 24 h se encontraron 4.43 log UFC/cm², mientras que a las 48 h hubo diferencias significativas al encontrar 6.11 log UFC/cm². En los tiempos de formación posteriores (72 y 144 h) no hubo diferencias significativas entre ellos y con respecto a las 48 h ($p > 0.05$). Por lo que, estos resultados demuestran que a partir de las 48 h el número de bacterias se mantiene igual y por esta razón se seleccionó este tiempo de formación de biopelículas para evaluar el efecto de los tratamientos.

La caracterización de la formación de biopelículas muestra el comportamiento de la bacteria en sus distintas etapas de desarrollo. Distintos factores afectan la formación de la biopelícula, algunos externos que dependen del ambiente como la temperatura, los nutrientes y las características de la superficie; mientras que los factores internos dependen de la misma bacteria como su hidrofobicidad, factores de virulencia como fimbrias y pilis y los mecanismos de comunicación célula a célula.

Estudios previos han evaluado la formación de biopelícula de *Salmonella* en superficies de acero inoxidable. Valeriano et al. (2012) encontraron 5.78 log UFC/cm² de células de *S. Enteritidis* adheridas a cupones de acero inoxidable después de un período de incubación de 48 h a 37°C. Estos autores reportan que la cuenta de células bacterianas se mantiene sin cambios desde las 48 h hasta las 96 h; sin embargo, después de 144 h de crecimiento se aumentó el número de bacterias adheridas hasta alcanzar un conteo de 7.76 log UFC/cm² a

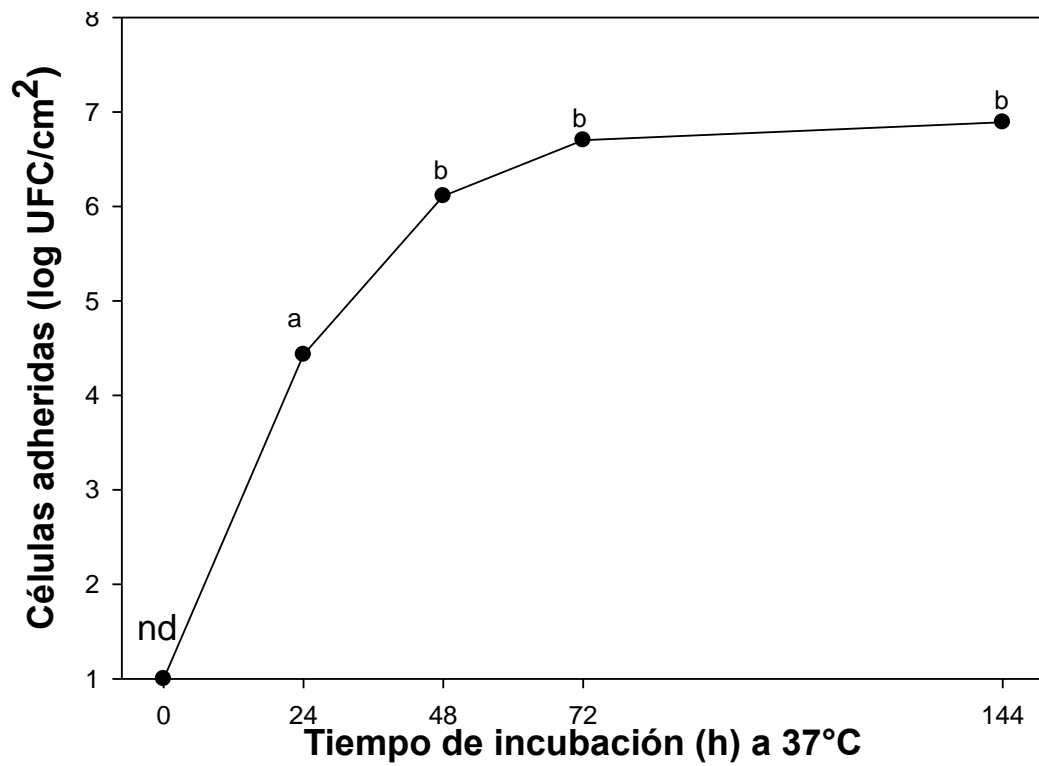
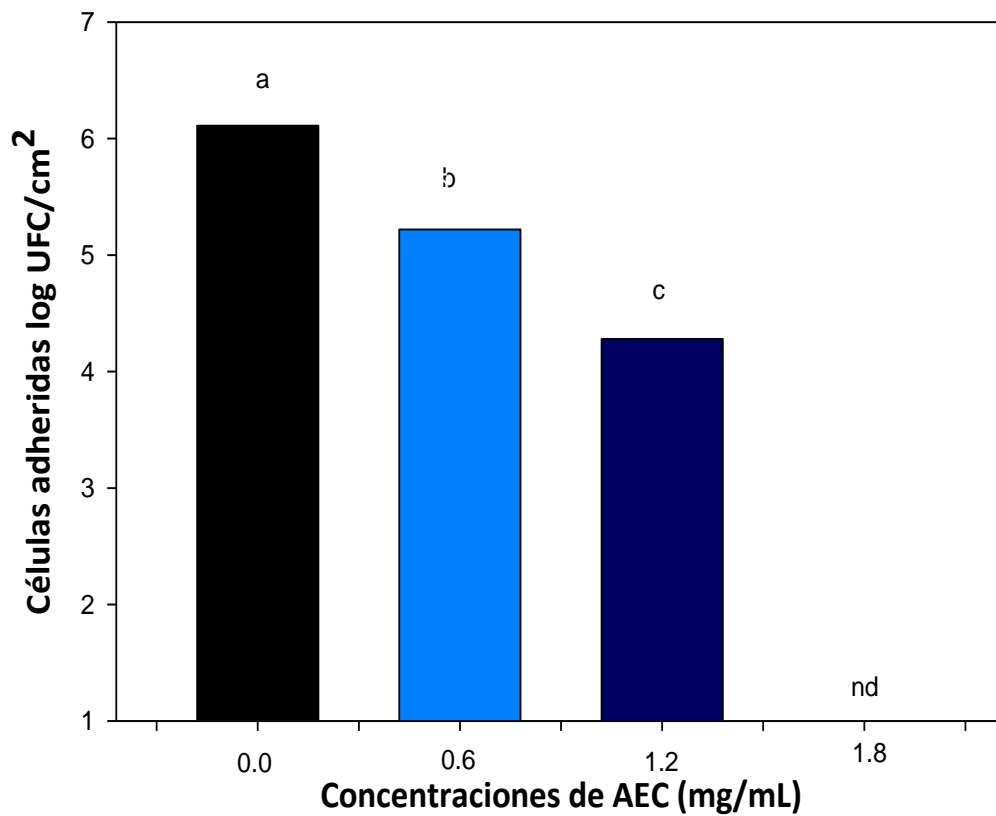


Figura 4. Formación de biopelículas de *S. Typhimurium* de 0 a 144 h sobre superficies de acero inoxidable. Diferentes literales indican diferencia significativa entre tiempos de incubación ($P \leq 0.05$). nd: No se detectaron células adheridas.

las 240 h. Los resultados de esta investigación son similares a los del presente estudio, ya que no se encuentra diferencia después de 48 h. Sin embargo el número de células adheridas encontrado a este tiempo son menores que las del presente estudio, esto puede ser atribuido a serovar, medio de cultivo, superficie de contacto e incluso la manera de formar las biopelículas. Por otro lado, Giaouris y Nychas (2006), utilizando un estudio similar con *S. enterica* serovar Enteritidis demostraron que la densidad de la población de biopelícula sobre cupones de acero inoxidable alcanzó aproximadamente 6 log UFC/cm² después de 15 días de incubación a 20°C. En nuestro estudio, se detectó mayor densidad población en las biopelículas de *S. Typhimurium* en un tiempo de incubación más corto; sin embargo la temperatura de incubación empleada fue mayor y esto puede aumentar el crecimiento bacteriano.

6.1.4. Efecto de AEC sobre la Erradicación de Biopelículas de *S. Typhimurium*

En la Figura 5 se muestra el efecto sobre la erradicación de biopelículas formadas por 48 h. Con la concentración de 1.2 mg/mL se observó una reducción de 1.83 log UFC/cm² respecto al control (6.11 log UFC/cm²), mientras que la concentración de erradicación fue de 1.8 mg/mL. Lo anterior coincide con otros reportes donde la conformación de las células de las biopelículas son típicamente más resistentes a los agentes antimicrobianos en comparación con las bacterias en estado planctónico (Behnke et al., 2011). Joseph et al. (2001) demuestran que un tratamiento con cloro (10 ppm, 10 min) es suficiente para eliminar 6 log de células planctónicas de *Salmonella* spp. pero se da una disminución de menos de 1 log en las células asociadas a biopelículas. Por lo tanto, esto demuestra que las biopelículas son más resistentes que las células planctónicas.



Typhimurium formadas durante 48 h. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). nd: No se detectaron células adheridas.

Esto nos indica la resistencia que las bacterias adquieren con el transcurso del tiempo y esto en gran medida podría ser que la estructura de la biopelícula se vuelve más compleja. Esta alta tolerancia y resistencia de las bacterias que forman biopelículas puede ser atribuida a: la difusión limitada de antibacterianos a través de la matriz extracelular, el desarrollo de la resistencia fenotípica por transferencia de genes y persistencia de células en biopelículas (Jahid y Ha, 2012). Además, no sólo hace que las bacterias adquieran resistencia a los agentes antimicrobianos, también han sido reportadas otras ventajas de las células en biopelículas, como protegerlas del sistema inmune del huésped y el aumento de la patogenicidad (Chamdit y Siripermpool, 2012).

El mecanismo anti-biopelícula de los aceites esenciales no ha sido totalmente elucidado pero se ha atribuido principalmente a sus constituyentes terpénicos y posiblemente al sinergismo entre todos los componentes. El aceite esencial de clavo tiene terpenos como compuestos principales y éstos pueden participar en la separación de las células planctónicas de la biopelícula contribuyendo a la erradicación de la misma. Como se mencionó anteriormente, los aceites esenciales por su naturaleza lipofílica hacen las membranas bacterianas más permeables, de modo que la pérdida de iones y contenido celular conduce a la muerte bacteriana (Saad et al., 2013) y con esto facilitando la erradicación de las biopelículas. Sin embargo el efecto de aceites esenciales sobre la morfología de los agregados bacterianos no se ha esclarecido.

Por otro lado, Liu et al. (2015) evaluaron la eficacia de combinar terpenos con antibióticos contra biopelículas de *S. Typhimurium*. En particular, el eugenol mostró un efecto sinérgico con estreptomycin al reducir la cantidad de biomasa y viabilidad celular de las biopelículas. Además, mediante microscopia electrónica de barrido se evidenciaron los cambios en la arquitectura de estas biopelículas, observando microcolonias más dispersas y un menor número de agregados en comparación con los tratamientos individuales. Estos resultados son similares a otros estudios como el de Palaniappan y Holley (2010) quienes observaron que el tratamiento con bajas concentraciones de carvacrol y timol

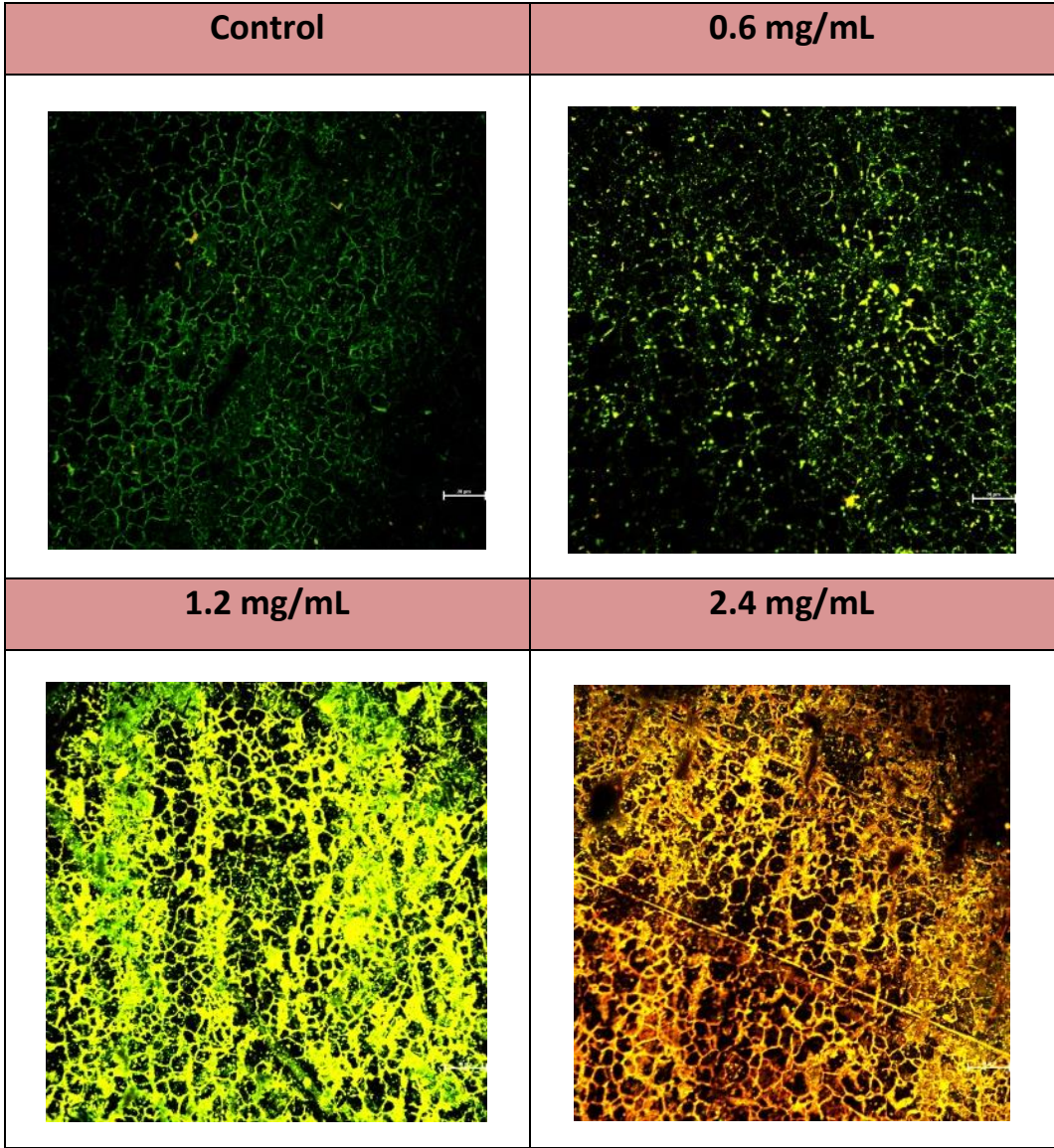
mostraron mayor susceptibilidad bacteriana a la ampicilina, penicilina y tetraciclina, y también demostraron la sinergia entre cinamaldehído y ampicilina.

Estos efectos sinérgicos podrían ser atribuidos a que los aceites esenciales pueden penetrar y dañar biopelículas (Nuryastuti et al., 2009). Análisis de inmunofluorescencia de biopelículas de *S. Typhimurium* mostraron una baja sensibilidad al ser expuestas a estreptomina. En contraste, al comparar la combinación de esta misma con eugenol se observó mayor efecto atribuido a que los terpenos podrían facilitar el acceso de antibióticos a las biopelículas (Liu et al., 2015). De manera similar, la combinación de farnesol con gentamicina presentó sinergismo facilitando la entrada de gentamicina en las biopelículas de *S. aureus* (Jabra-Rizk et al., 2006). Estos resultados demuestran la eficacia de los aceites esenciales en combinación con otros métodos antibacterianos.

6.1.5. Análisis de Viabilidad Celular por Microscopía Laser Confocal De Barrido en Biopelículas de *S. Typhimurium* Tratadas con AEC

El análisis de las biopelículas de *S. Typhimurium* formadas durante 48 h se llevó a cabo por medio de microscopía confocal de barrido. Después de 48 h de incubación, en la imagen correspondiente al control se observa una biopelícula bien establecida, que se aprecia estructuralmente más compleja y con microcolonias formadas en el cupón de acero inoxidable (Cuadro 6). Además, se puede observar más fluorescencia verde lo que indica la presencia de células vivas. En las imágenes correspondientes a los tratamientos con AEC se puede observar cómo progresivamente al aumentar la concentración va aumentando el número de células muertas, que se ve reflejado en el cambio de color (rojo) y lo que además concuerda con el conteo de células viables en placa.

Cuadro 6. Imágenes de microscopía confocal de barrido de biopelículas de *S. Typhimurium* tratadas con AEC. Barra de escala – 20 μm



En otros estudios se ha evaluado la viabilidad celular y cambios en la matriz de las biopelículas con microscopia confocal de laser de barrido (Chen et al., 2015; Wang et al., 2013). En concordancia con nuestro estudio, Nostro et al. (2009) reportan que biopelículas de *S. aureus* al ser analizados por microscopia confocal de laser de barrido muestran fluorescencia verde casi en su totalidad, lo que indica mayor número de bacterias viables, además de observarse mayor número de agregados bacterianos. Mientras que estas biopelículas al ser expuestas a carvacrol, un terpeno presente en algunos aceites esenciales, se pueden observar cambios en la arquitectura de la biopelícula al encontrarse células más dispersas, con menor número de microcolonias acumuladas y con variación en la viabilidad celular (mayor fluorescencia roja).

6.1.6. Análisis de Morfología Superficial de Biopelículas por AFM Tratadas con AEC

Se analizaron por AFM las biopelículas formadas en los cupones de acero inoxidable sin tratamiento y con AEC con el fin de confirmar los efectos de los tratamientos sobre las biopelículas preformadas. En la Figura 6 se muestran las imágenes obtenidas con AFM, se puede apreciar que hay un cambio entre tratamientos, observándose menores números de valles y montañas con el AEC en comparación con el control. En el Cuadro 7 se muestran cambios en la morfología superficial, por ejemplo, en los valores de dimensión fractal las biopelículas tratadas con AEC tienen 2.188 en diferencia con el control (2.295).

La tecnología AFM permite obtener imágenes en tres dimensiones y la medición de estructuras desde escalas moleculares hasta atómicas. En un área definida por el usuario, los datos pueden ser calculados para varios parámetros de rugosidad, área de superficie y morfología en el acabado de la superficie. Las disminuciones en los parámetros de rugosidad mostrados por AFM, indican que las superficies tratadas muestran reducción de la contaminación bacteriana y la

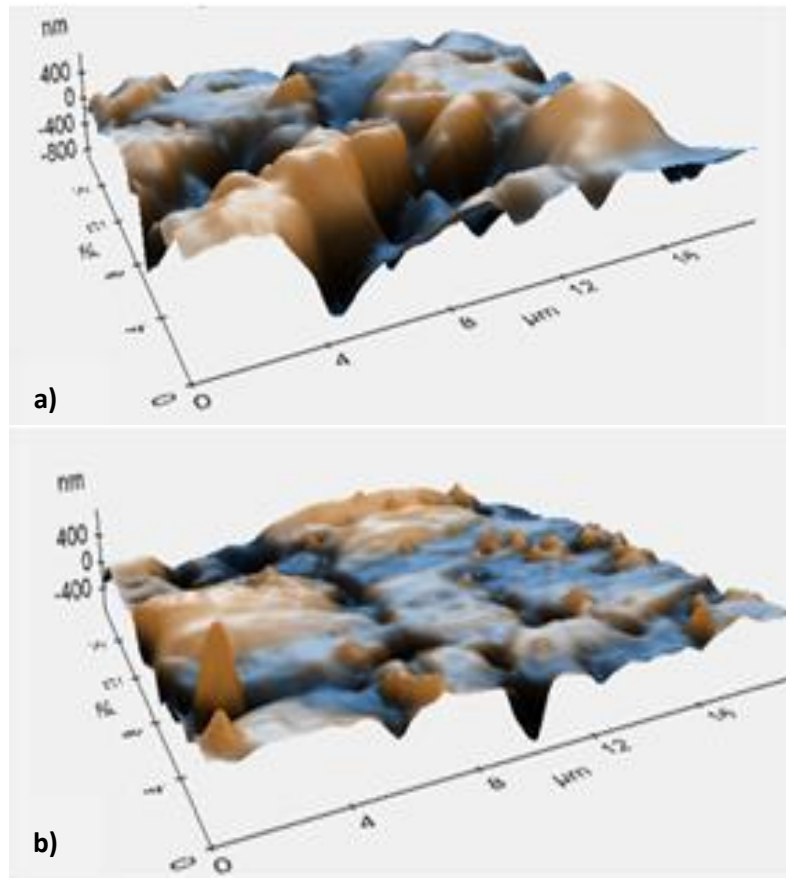


Figura 6. Micrografías por AFM de biopelículas de *S. Typhimurium* formadas por 48 h a) control b) AEC (1.8 mg/mL)

Cuadro 7. Efecto del AEC sobre la morfología superficial de biopelículas de *S. Typhimurium* obtenidos por AFM.

	Control	AEC
Dimensión fractal¹	2.295	2.188
Altura mínima (nm)	-911	-724
Altura máxima (nm)	695	782.82
Rugosidad promedio² (nm)	200.56	89.23
Media cuadrática rugosidad (nm)	268.13	128.131

¹Dimensión fractal: Evalúa complejidad geométrica de una superficie, en relación un tamaño de celda en tres dimensiones a la superficie mediante la asignación de un valor de 2 a 3. Una superficie plana tendría un valor de 2.00, y una superficie áspera infinitamente tendría un valor de 3.00.

²Rugosidad promedio: Es el valor medio de la superficie con respecto al plano central.

formación de biopelículas (Arnold y Bailey, 2000). Por lo tanto, estas imágenes nos indican que las biopelículas tratadas con AEC sufren cambios en su estructura al volverla más fluida lo cual podría representar una ventaja para tratamientos consecutivos.

6.1.7. Conclusión Etapa 1

El AEC (1.8 mg/mL) presentó capacidad para erradicar biopelículas de *S. Typhimurium*, lo cual podría atribuirse a los terpenos que lo constituyen, siendo eugenol su principal componente. Adicionalmente, se detectó una reducción de la viabilidad de las células de *Salmonella* en los agregados, lo cual podría atribuirse a los cambios morfológicos con el AEC.

6.2. Etapa 2. Efecto de UV-C sobre Biopelículas de *S. Typhimurium*

6.2.1. Efecto de Irradiación UV-C sobre la Erradicación de Biopelículas de *S. Typhimurium*

Los resultados del efecto de la irradiación UV-C sobre biopelículas de *S. Typhimurium* se muestran en la Figura 7. En la dosis más baja (39.52 mJ/cm²) se logró reducir 1.22 log UFC/cm² de células adheridas al cupón, mientras que la dosis más alta (620.4 mJ/cm²) redujo 3.12 log UFC/cm² respecto al control (6.10 log UFC/cm²). La carga microbiana disminuyó progresivamente al aumentar el tiempo de irradiación UV-C en todos los tratamientos evaluados. El efecto antibacteriano de los tratamientos con irradiación UV-C se atribuye a un mecanismo fotoquímico que altera la estructura química del ADN mediante la

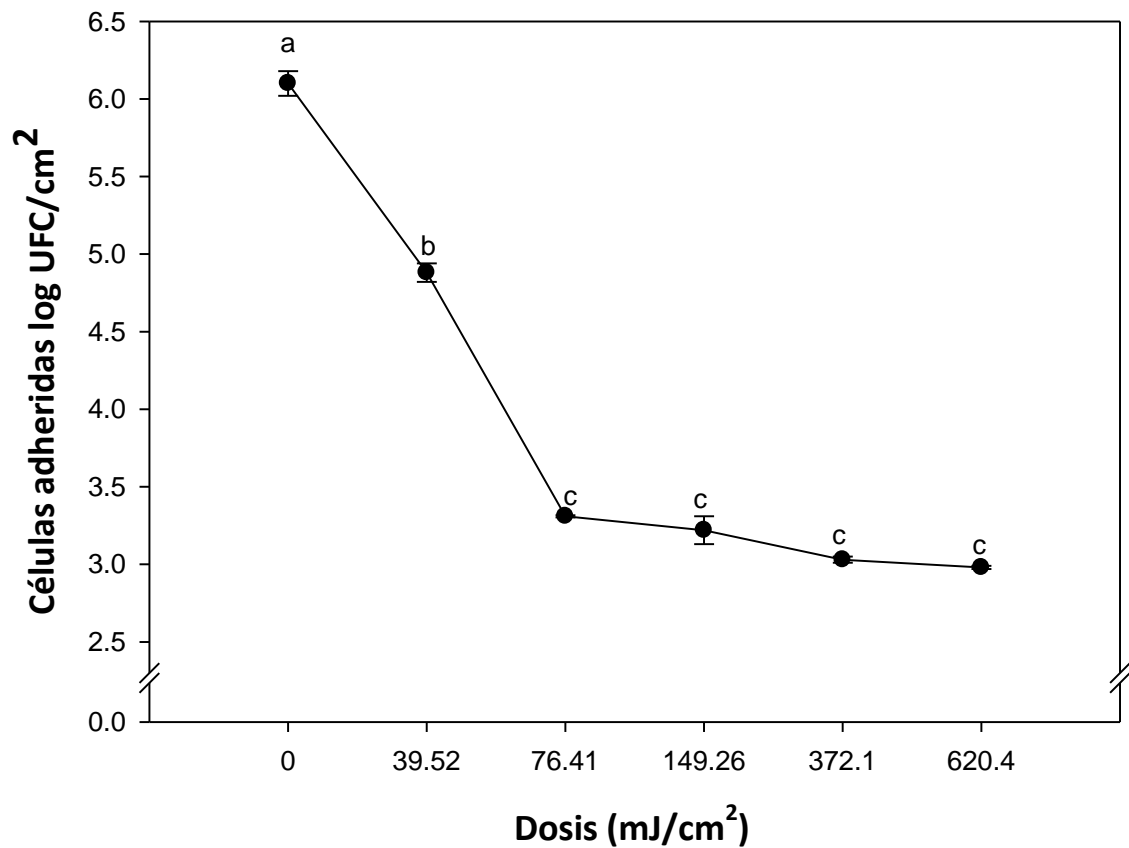


Figura 7. Efecto de la irradiación UV-C sobre la erradicación de biopelículas de *S. Typhimurium* formadas durante 48 h. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

formación de un dímero de timina, previniendo la replicación y provocando lesión celular y por lo tanto la muerte. Además, se ha propuesto que en algunas ocasiones la UV puede dar lugar a vapores procedentes de las fuentes de agua celulares, provocando desequilibrios osmóticos, contracción citoplasmática y ruptura celular (Montgomery y Banerjee, 2015). En este estudio se hipotetiza que estos efectos ocasionan la erradicación de biopelículas de *S. Typhimurium*; sin embargo, el cómo se afecta la morfología de agregados bacterianos por efecto de la UV no se ha sido esclarecido.

Por otro lado, el efecto antibiopelícula de la irradiación UV-C también puede ser atribuido a la capacidad de penetrar en la matriz de SPE, ya que se ha reportado que UV-C puede penetrar hasta 2 mm (Hillegas y Demirci, 2003). Esto es importante, ya que Ryu y Beuchat (2005) observaron que biopelículas de *E. coli* O157:H7 formadas en superficies de acero inoxidable presentaron una mayor resistencia al cloro debido a la matriz de SPE. La resistencia de las bacterias a los productos químicos se atribuye a que las células son protegidas por las SPE dentro de la matriz.

En un estudio previo se evaluó el efecto de UV-C en biopelículas de *S. Typhimurium* formadas durante 72 h a 15°C sobre cupones de acero inoxidable, encontrándose una reducción de 4.7 y 6.3 log UFC/cm² después de ser irradiadas a dosis de 24 mJ/cm² y 72 mJ/cm², respectivamente (Jahid et al., 2014). Estas diferencias en los resultados en comparación con los de este estudio pueden ser atribuidas a variaciones en las condiciones experimentales tales como tiempo y temperatura de incubación. En relación a biopelículas formadas en superficies alimentarias, Montgomery y Banerjee (2015) reportan el efecto de la irradiación de UV pulsada (10 s, distancia 4.5-8.8 cm) en la reducción de células en estado de biopelícula (48 h) de *E. coli* 0156:H7 (0.6–2.2 log UFC/mL, 3.9 log UFC/mL) y *L. monocytogenes* (1.1–3.8 log UFC/mL, 2.7 log UFC/mL) en hojas de lechuga y en polietileno de baja densidad, respectivamente. Estos autores encontraron que entre mayor duración de exposición de biopelículas a la luz UV incrementa significativamente la

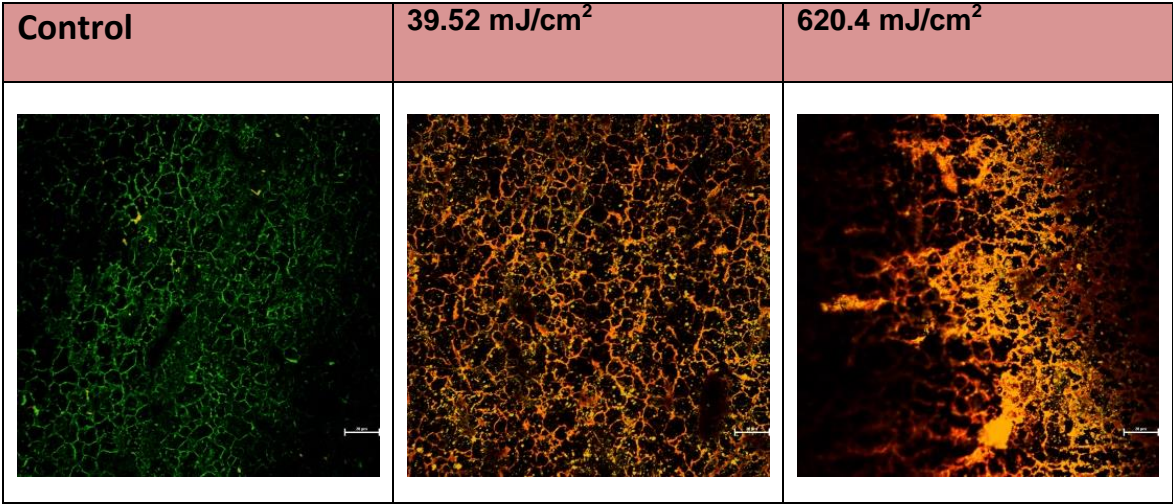
reducción de células presentes en la biopelícula. Los resultados de estudios previos demuestran que la irradiación UV es efectiva para la erradicación de biopelículas.

Por otro lado, otro estudio revela que la matriz alimentaria es importante para el efecto de irradiación UV-C ya que *L. monocytogenes* sobrevivió en el extracto de salmón ahumado a la radiación UV-C significativamente mejor que las bacterias cultivadas y adheridas en caldo Soya Trypticase adicionado con glucosa con o sin NaCl al 5%. Es bien sabido que la eficacia del tratamiento UV-C está muy influenciada por la presencia de material orgánico, ya que la radiación UV-C es absorbida por los materiales orgánicos y esto puede reflejarse en su baja capacidad de penetrar (Andersen et al., 2006). Por estas razones, podría ser útil la combinación de UV-C con agentes antibacterianos para mejorar su efecto y reducir las dosis.

6.2.2. Análisis de Viabilidad Celular por Microscopía Laser Confocal De Barrido en Biopelículas de *S. Typhimurium* Irradiadas con UV-C

El análisis de las biopelículas de *S. Typhimurium* formadas por 48 h se llevó a cabo por medio de microscopia confocal de barrido (Cuadro 8). Después de 48 h de incubación, en la imagen correspondiente al control se observa una biopelícula bien establecida, que se aprecia estructuralmente más compleja y con microcolonias formadas de manera irregular en el cupón de acero inoxidable. Además, se puede observar más fluorescencia verde lo que indica la presencia de células vivas. En los tratamientos con irradiación UV-C se puede observar cambios en la viabilidad celular, ya que se observa mayor fluorescencia roja o naranja correspondiente a células muertas.

Cuadro 8. Imágenes de microscopía confocal de barrido de biopelículas de *S. Typhimurium* irradiadas con UV-C. Barra de escala – 20 μm .



6.2.3. Análisis de Morfología Superficial de Biopelículas por AFM Tratadas con AEC

Se analizaron por AFM las biopelículas formadas en los cupones de acero inoxidable sin tratamiento y con irradiación UV-C con el fin de confirmar los efectos de los tratamientos sobre las biopelículas preformadas. En la Figura 8 se muestran las imágenes obtenidas con AFM, se puede apreciar que hay un cambio entre tratamientos, observándose superficies con menor cantidad de montañas y valles con la UV-C en comparación con el control. En el Cuadro 9 se muestran datos sobre cambios en la morfología superficial de las biopelículas tanto del control como en UV-C. Se puede observar que el control tiene el valor más elevado (2.295) de dimensión fractal, mientras que la biopelícula tratada con UV-C mostró un menor valor (2.231). Sin embargo, estos cambios en la morfología superficial no se ven tan pronunciados como lo es en los tratamientos con AEC.

6.2.4. Conclusión Etapa 2

La irradiación con UV-C reduce la viabilidad de células de *S. Typhimurium* en biopelículas; sin embargo, dosis mayores a los 76.41 mJ/cm² no presentaron diferencia significativa en afectar la viabilidad celular, sin encontrarse dosis de erradicación, hasta la dosis mayor estudiada de 620.4 mJ/cm². Adicionalmente, se observaron cambios morfológicos y en la rugosidad superficial de las biopelículas expuestas a UV-C.

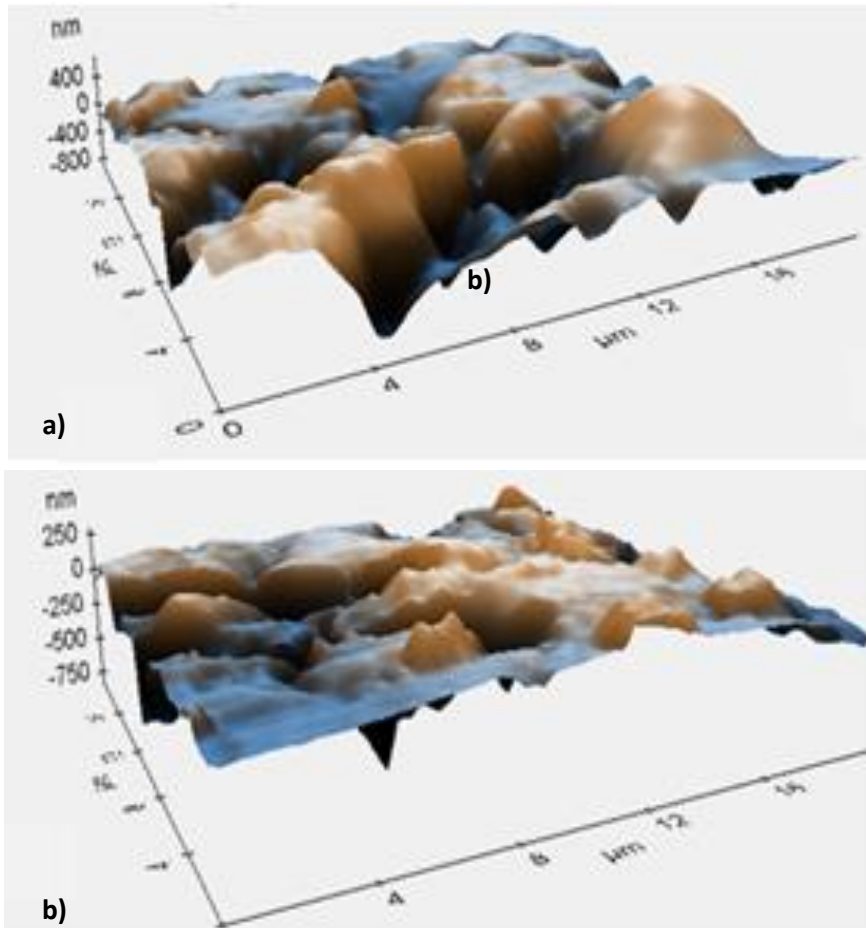


Figura 8. Micrografías por AFM de biopelículas de *S. Typhimurium* formadas por 48 h a) control b) UV-C (76.41 mJ/cm^2)

Cuadro 9. Efecto de irradiación UV-C sobre la morfología superficial de biopelículas de *S. Typhimurium* obtenidos por AFM.

	Control	UV-C
Dimensión fractal¹	2.295	2.231
Altura mínima (nm)	-911	-823.17
Altura máxima (nm)	695	291.337
Rugosidad promedio² (nm)	200.56	97.92
Media cuadrática rugosidad (nm)	268.13	124.6

¹Dimensión fractal: Evalúa complejidad geométrica de una superficie, en relación un tamaño de celda en tres dimensiones a la superficie mediante la asignación de un valor de 2 a 3. Una superficie plana tendría un valor de 2.00, y una superficie áspera infinitamente tendría un valor de 3.00.

²Rugosidad promedio: Es el valor medio de la superficie con respecto al plano central.

6.3. Etapa 3. Efecto del AEC en Combinación con UV-C sobre Biopelículas de *S. Typhimurium*

6.3.1. Efecto del AEC en Combinación con Irradiación UV-C sobre la Erradicación de Biopelículas de *S. Typhimurium*

Los resultados de este estudio revelaron que todas las combinaciones mostraron un efecto sinérgico respecto a la reducción de la viabilidad celular de *S. Typhimurium* en su estado de biopelícula (Figura 9). La concentración del AEC de 1.2 mg/mL y 76.41 mJ/cm² de irradiación UV-C mostró tener el mejor efecto al reducir 6.61 log de células presentes en las biopelículas ($P \leq 0.05$), mientras que la concentración de 0.6 mg/mL y 39.52 mJ/cm² de irradiación lograron reducir 3.56 log respecto al control. El tratamiento que dio menor efecto fue donde se usó 0.3 mg/mL con 15.33 mJ/cm² de irradiación UV-C. Con estos resultados, se puede observar la ventaja de la combinación de agentes desinfectantes/antibiopelícula para lograr la reducción de las dosis y/o concentraciones de estos. El efecto de la combinación de UV-C y AEC en la reducción de células presentes en biopelículas, puede ser atribuido a un sinergismo entre los diferentes mecanismos antibacterianos de cada tratamiento de manera individual.

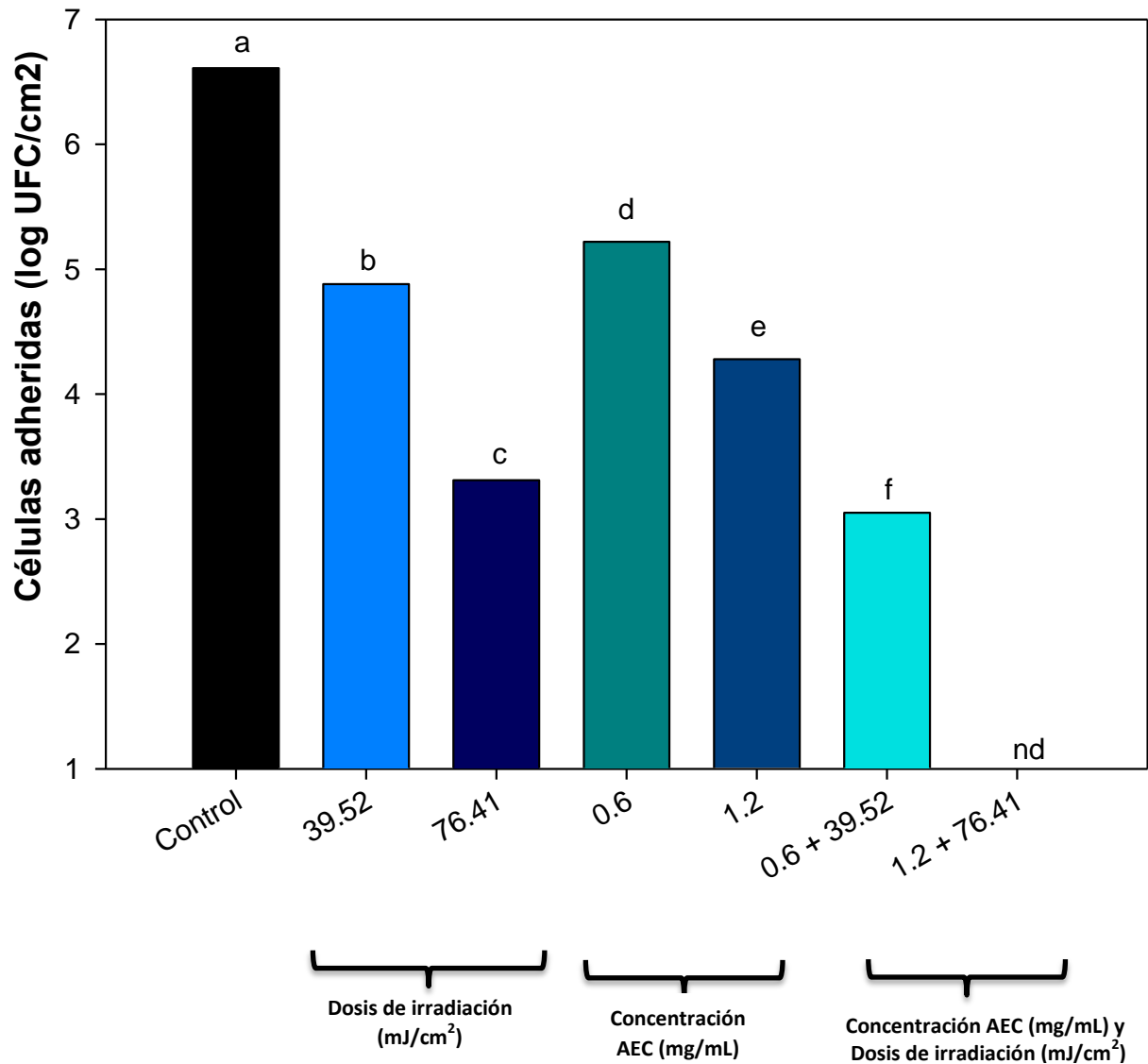


Figura 9. Efecto de la combinación de AEC y UV-C sobre la erradicación de biopelículas de *S. Typhimurium* formadas durante 48 h. Diferentes literales indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). nd: No se detectaron células adheridas.

Tajik et al. (2015) utilizaron aceite esencial de *Zataria multiflora* boiss una planta medicinal nativa de los países de Irán, Afganistán y Pakistán en combinación con radiación UV contra biopelículas de *L. monocytogenes*. Los resultados de este estudio demostraron que el efecto individual de cada uno de los tratamientos previamente mencionados da resultados promisorios para el control de biopelículas de este patógeno formadas en superficies de acero inoxidable. Sin embargo, al combinar estos dos mostraron tener un efecto antagonista lo cual no sugeriría combinar aceite esencial de esta planta con irradiación ultravioleta para el control de biopelículas. Estos resultados se oponen a los resultados encontrados en nuestro estudio donde la combinación de estos dos agentes se ve favorecida. Este efecto antagónico podría ser atribuido a factores como el tiempo de formación de biopelícula (6 y 12 días), composición del aceite esencial, dosis de irradiación e incluso la cepa bacteriana.

Por otro lado estudio se informó que la combinación de irradiación UV (1800 mWs/cm²) e hipoclorito de sodio (200 ppm) logró reducir 3.68 log UFC/cm² de *L. monocytogenes* en estado de biopelícula en cupones de acero inoxidable (Kim et al., 2016). Comparando este estudio con nuestra investigación, se puede observar que las dosis empleadas de hipoclorito de sodio son menores que las del AEC utilizado, sin embargo los consumidores cada día exigen productos naturales sin riesgos tóxicos. En este sentido, la combinación de AEC y UV-C parece una buena alternativa para la erradicación de biopelículas de *S. Typhimurium*.

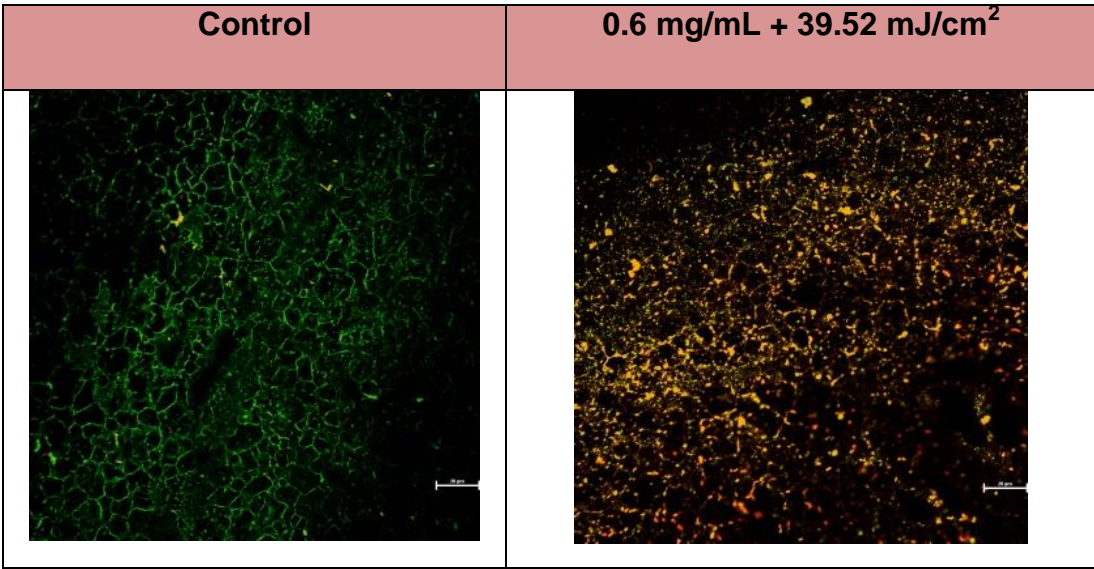
6.3.2. Análisis de Viabilidad Celular por Microscopía Laser Confocal De Barrido en Biopelículas de *S. Typhimurium* Tratadas con AEC en Combinación con Irradiación UV-C

El análisis de biopelículas de *S. Typhimurium* formadas por 48 h se llevó a cabo por medio de microscopia confocal de barrido (Cuadro 10). Después de 48 h de incubación, en la imagen correspondiente al control se observa una biopelícula bien establecida, que se aprecia estructuralmente más compleja y con microcolonias formadas de manera irregular en el cupón de acero inoxidable. Además, se puede observar más fluorescencia verde lo que indica la presencia de células vivas. Asimismo, también en la combinación de AEC y UV-C se aprecia cambios en la viabilidad celular con mayor cantidad de células muertas y cambios morfológicos en los agregados bacterianos, ya que tienen formas más irregulares y se pueden observar más dispersos. En conclusión, estas imágenes resultan complementarias y coinciden con lo reportado en el conteo en placas al disminuir la viabilidad celular de los agregados bacterianos.

6.3.3. Análisis de Morfología Superficial de Biopelículas por AFM Tratadas con AEC en Combinación con Irradiación UV-C

Se analizaron por AFM las biopelículas formadas en los cupones de acero inoxidable sin tratamiento y la combinación de AEC y UV-C, con el fin de confirmar los efectos de los tratamientos sobre las biopelículas preformadas. En la Figura 10 se muestran las imágenes obtenidas con AFM, se puede apreciar que hay un cambio entre tratamientos, observándose superficies más planas con la combinación de AEC y UV-C en comparación con el control. En el Cuadro 11 se muestran datos sobre cambios en la morfología superficial de las biopelículas tanto del control como de los tratamientos. Se puede observar que el control tiene el valor más elevado (2.295) de dimensión fractal, mientras que

Cuadro 10. Imágenes de microscopía confocal de barrido de biopelículas de *S. Typhimurium* tratadas con AEC en combinación con irradiación UV-C. Barra de escala – 20 μm .



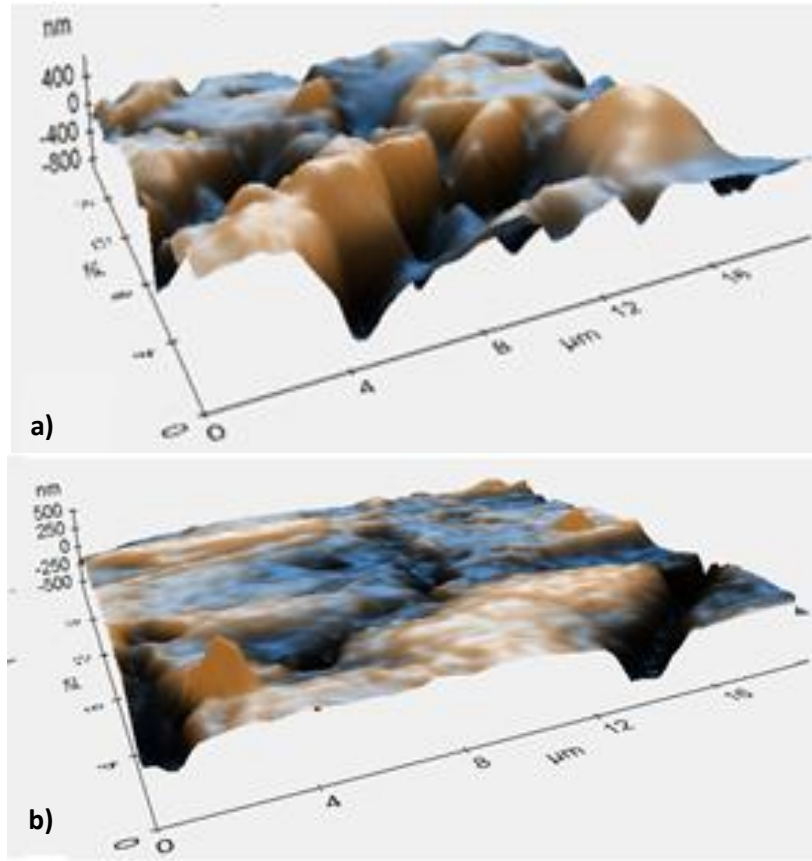


Figura 10. Micrografías por AFM de biopelículas de *S. Typhimurium* formadas por 48 h a) control b) AEC (0.6 mg/mL)+ UV-C (39.52 mJ/cm²)

Cuadro 11. Efecto del AEC en combinación con irradiación UV-C sobre la morfología superficial de biopelículas de *S. Typhimurium* obtenidos por AFM.

	Control	AEC + UV-C
Dimensión fractal¹	2.295	2.169
Altura mínima (nm)	-911	-631
Altura máxima (nm)	695	292
Rugosidad promedio² (nm)	200.56	46
Media cuadrática rugosidad (nm)	268.13	62

¹Dimensión fractal: Evalúa complejidad geométrica de una superficie, en relación un tamaño de celda en tres dimensiones a la superficie mediante la asignación de un valor de 2 a 3. Una superficie plana tendría un valor de 2.00, y una superficie áspera infinitamente tendría un valor de 3.00.

²Rugosidad promedio: Es el valor medio de la superficie con respecto al plano central.

la biopelícula tratada con la combinación de AEC y UV-C mostró el menor valor (2.169). De igual manera, el control presentó el valor más alto de rugosidad promedio (200.56 nm) mientras que la combinación presentó el menor valor (46 nm).

Esto indica que las biopelículas del control tienen una superficie más áspera en comparación con las de la combinación, tal como se puede apreciar en las imágenes de la Figura 10. De manera que, se podrían clasificar las biopelículas desde la que sufrió menos cambios superficiales hasta la que resultó más afectada: Control > UV-C > AEC > AEC+UV-C. Estos análisis dan indicios que las biopelículas tratadas con AEC sufren cambios al volver más fluida su estructura, lo cual podría hipotetizar que favorece la penetración o efectividad de la radiación UV-C, por lo tanto se observa mayor efecto con la combinación.

6.3.4. Conclusión Etapa 3

La combinación de AEC con irradiación UV-C permitió usar dosis más bajas de ambas tecnologías para erradicar las biopelículas de *Salmonella*; intensificando el efecto de la UV-C para erradicar agregados bacterianos. El efecto de la combinación de las dos tecnologías sobre la viabilidad y morfología superficial fueron similares a los observados en las aplicaciones individuales.

VII. ESTUDIOS POSTERIORES

Para futuros estudios como continuación de este trabajo se recomienda lo siguiente:

- Evaluar cambios de los componentes de las sustancias exopoliméricas celulares de biopelículas de *Salmonella*: Polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN.
- Caracterizar las biopelículas de *S. Typhimurium* con diferentes temperaturas, medio de cultivo y superficies de adhesión.
- Analizar los cambios en la viscosidad de biopelículas de *S. Typhimurium* expuestas a aceites esenciales.
- Formar biopelículas de *S. Typhimurium* en superficies de distintos materiales de interés alimentario.

VIII. REFERENCIAS

- Abdallah, F. B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., y Bakhrouf, A. (2009). Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 394-398.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., y Chihib, N.-E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 197(7), 453-472.
- Alviano, D. S., y Alviano, C. S. (2009). Plant extracts: Search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 106-121.
- Andersen, B., Bånrud, H., Bøe, E., Bjordal, O., y Drangsholt, F. (2006). Comparison of UV C light and chemicals for disinfection of surfaces in hospital isolation units. *Infection Control*, 27(07), 729-734.
- Antoniouand, K., y Frank, J. F. (2005). Removal of *Pseudomonas putida* biofilm and associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning. *Journal of Food Protection*, 68(2), 277-281.
- Araújo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., y Simões, M. (2011). Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Formatex, Spain, 826-834.
- Arnold, J., y Bailey, G. (2000). Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poultry Science*, 79(12), 1839-1845.
- Bandara, H., Harb, A., Kolacny, D., Martins, P., y Smyth, H. D. C. (2014). Sound waves effectively assist tobramycin in elimination of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *in vitro*. *Aaps Pharmscitech*, 15(6), 1644-1654.

- Behnke, S., Parker, A. E., Woodall, D., y Camper, A. K. (2011). Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single-and dual-species cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7176-7184.
- Beloin, C., Roux, A., y Ghigo, J.-M. (2008). *Escherichia coli* biofilms *Bacterial Biofilms* (pp. 249-289): Springer.
- Bernbom, N., Vogel, B. F., y Gram, L. (2011). *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1), 69-73.
- CDC. (2013). Multistate Outbreak of *Salmonella Typhimurium* Infections Linked to Ground Beef (Final Update). Recuperado 15/05/2015, de <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-01-13/index.html>
- CDC. (2014). Human *Salmonella Typhimurium* Infections Linked to Exposure to Clinical and Teaching Microbiology Laboratories. Recuperado 15/05/2015, de <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-labs-06-14/index.html>
- CDC. (2015). *Salmonella*. Recuperado 13/05/2015, de <http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., y Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21(6), 501-506.
- Chamdit, S., y Siripermpool, P. (2012). Antimicrobial effect of clove and lemongrass oils against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(2), 28-36.
- Chen, D., Zhao, T., y Doyle, M. P. (2015). Single-and mixed-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella*, and their sensitivity to levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate. *Food Control*, 57, 48-53.
- Chmielewski, R., y Frank, J. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32.

- Choi, J., Lee, H. J., Cho, M. J., y Chang, S.-K. (2015). Micelle-assisted signaling of peracetic acid by the oxidation of pyreneboronic acid via monomer–excimer switching. *Talanta*, 141(0), 111-115.
- Chun, H., Kim, J., Lee, B., Yu, D., y Song, K. (2010). Effect of UV-C irradiation on the inactivation of inoculated pathogens and quality of chicken breasts during storage. *Food Control*, 21(3), 276-280.
- de Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., das Graças Cardoso, M., Alves, E., y Piccoli, R. H. (2010). Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 21(4), 549-553.
- De Souza, P. M., y Fernández, A. (2011). Effects of UV-C on physicochemical quality attributes and *Salmonella enteritidis* inactivation in liquid egg products. *Food Control*, 22(8), 1385-1392.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
- EFSA. (2015). Food-borne zoonotic diseases- *Salmonella*. Recuperado 15/05/2015, de <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella.htm>
- Elexson, N., Son, R., Rukayadi, Y., Zainazor, T. T., Ainy, M. N., Nakaguchi, Y., y Mitsuaki, N. (2013). Biosafety of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm from seafood using herbs and spices. *Journal of Life Medicine*, 1(3).
- Ferreira, C., Pereira, A., Melo, L., y Simões, M. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 845-854.
- Flemming, H.-C., y Ridgway, H. (2008). *Biofilm Control: Conventional and Alternative Approaches* (pp. 1-15): Springer Berlin Heidelberg.
- Flemming, H.-C., y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
- Ghafoor, A., Hay, I. D., y Rehm, B. H. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5238-5246.
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., . . . Nychas, G.-J. (2014). Attachment and biofilm formation by

foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3), 298-309.

Harvey, J., Keenan, K., y Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380-392.

Heilmann, C., y Götz, F. (2010). Cell–cell communication and biofilm formation in gram-positive bacteria. *Bacterial Signaling*, 1, 7-22.

Hillegas, S. L., y Demirci, A. (2003). Inactivation of *Clostridium sporogenes* in clover honey by pulsed UV-light treatment. Paper presented at the 2003 ASAE Annual Meeting.

Hyltdgaard, M., Mygind, T., y Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12), 1-24.

Iannitelli, A., Grande, R., Stefano, A. D., Giulio, M. D., Sozio, P., Bessa, L. J., . . . Cellini, L. (2011). Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8), 5039-5051.

Jabra-Rizk, M., Meiller, T., James, C., y Shirtliff, M. (2006). Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1463-1469.

Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., y Palombo, E. A. (2013). Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*, 29(1), 125-130.

Jahid, I. K., y Ha, S.-D. (2012). A review of microbial biofilms of produce: Future challenge to food safety. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 299-316.

Jahid, I. K., Han, N. R., Srey, S., y Ha, S.-D. (2014). Competitive interactions inside mixed-culture biofilms of *Salmonella* Typhimurium and cultivable indigenous microorganisms on lettuce enhance microbial resistance of their sessile cells to ultraviolet C (UV-C) irradiation. *Food Research International*, 55, 445-454.

Joseph, B., Otta, S., Karunasagar, I., y Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 367-372.

- Kaplan, J. á. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205-218.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., y Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2633-2636.
- Karatan, E., y Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310-347.
- Kavanaugh, N. L., y Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4057-4061.
- Kim, M., Park, S. Y., y Ha, S.-D. (2016). Synergistic effect of a combination of ultraviolet-C irradiation and sodium hypochlorite to reduce *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and eggshell surfaces. *Food Control*, 70, 103-109.
- Krug, P. W., Larson, C. R., Eslami, A. C., y Rodriguez, L. L. (2012). Disinfection of foot-and-mouth disease and African swine fever viruses with citric acid and sodium hypochlorite on birch wood carriers. *Veterinary Microbiology*, 156(1), 96-101.
- Leonard, C. M., Virijevic, S., Regnier, T., y Combrinck, S. (2010). Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *South African Journal of Botany*, 76(4), 676-680.
- Li, W., Liu, H., y Xu, Q. (2012). Extracellular dextran and DNA affect the formation of *Enterococcus faecalis* biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. *Journal of Endodontics*, 38(7), 894-898.
- Li, Y.-H., y Tian, X. (2012). *Quorum sensing* and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 12(3), 2519-2538.
- Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C., y Maillard, J.-Y. (2012). Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1589-1596.
- Liu, Q., Niu, H., Zhang, W., Mu, H., Sun, C., y Duan, J. (2015). Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against

planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 60(5), 421-430.

López, F. E., de las Mercedes Pescaretti, M., Morero, R., y Delgado, M. A. (2012). *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? *Food Research International*, 45(2), 842-851.

Mansor, A., Shamsudin, R., Adzahan, N. M., y Hamidon, M. N. (2014). Efficacy of ultraviolet radiation as non-thermal treatment for the inactivation of *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 in pineapple fruit juice. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 173-180.

Martín-Espada, M., D'ors, A., Bartolomé, M., Pereira, M., y Sánchez-Fortún, S. (2014). Peracetic acid disinfectant efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on polystyrene surfaces and comparison between methods to measure it. *LWT-Food Science and Technology*, 56(1), 58-61.

Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., . . . Serio, A. (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794-803.

McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., y Kjelleberg, S. (2011). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39-50.

Moen, B., Rudi, K., Bore, E., y Langsrud, S. (2012). Subminimal inhibitory concentrations of the disinfectant benzalkonium chloride select for a tolerant subpopulation of *Escherichia coli* with inheritable characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4), 4101-4123.

Montgomery, N. L., y Banerjee, P. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in biofilms by pulsed ultraviolet light. *BMC research notes*, 8(235), 1-12.

Naveed, R., Hussain, I., Mahmood, M. S., y Akhtar, M. (2013a). In vitro and in vivo evaluation of antimicrobial activities of essential oils extracted from some indigenous spices. *Pakistan Veterinary Journal*, 33(4), 413-417.

Naveed, R., Hussain, I., Tawab, A., Tariq, M., Rahman, M., Hameed, S., . . . Iqbal, M. (2013b). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-

- drug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1-10.
- Nazer, A., Kobilinsky, A., Tholozan, J.-L., y Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiology*, 22(5), 391-398.
- NCSS. (2007). Number Cruncher Statistical Systems. Hintze JL. EUA.
- Nguyen, H., Yang, Y., y Yuk, H. (2014). Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 383-388.
- Nguyen, H. D. N., y Yuk, H.-G. (2013). Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*, 29(1), 236-240.
- Nostro, A., Marino, A., Blanco, A. R., Cellini, L., Di Giulio, M., Pizzimenti, F., . . . Bisignano, G. (2009). In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *Journal of Medical Microbiology*, 58(6), 791-797.
- Nuryastuti, T., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Irvati, S., Aman, A. T., y Krom, B. P. (2009). Effect of cinnamon oil on icaA expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6850-6855.
- Palaniappan, K., y Holley, R. A. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2), 164-168.
- Pawar, V., y Thaker, V. (2006). In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 49(4), 316-323.
- Perumal, P., Wand, M., Sutton, J., y Bock, L. (2014). Evaluation of the effectiveness of hydrogen-peroxide-based disinfectants on biofilms formed by Gram-negative pathogens. *Journal of Hospital Infection*, 87(4), 227-233.
- Prashar, A., Locke, I. C., y Evans, C. S. (2006). Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*, 39(4), 241-248.

- Raut, J. S., y Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264.
- Renner, L. D., y Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*, 36(05), 347-355.
- Römling, U., y Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, 272(6), 541-561.
- Rushdy, A. A., y Othman, A. S. (2011). Bactericidal efficacy of some commercial disinfectants on biofilm on stainless steel surfaces of food equipment. *Annals of Microbiology*, 61(3), 545-552.
- Rutala, W. A., Gergen, M. F., y Weber, D. J. (2012). Efficacy of improved hydrogen peroxide against important healthcare-associated pathogens. *Infection Control*, 33(11), 1159-1161.
- Ryu, J.-H., y Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 247-254.
- Saad, N. Y., Muller, C. D., y Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5), 269-279.
- Santacruz-Gomez, K., Silva-Campa, E., Álvarez-García, S., Mata-Haro, V., Soto-Puebla, D., y Pedroza-Montero, M. (2014). An AFM approach of RBC micro and nanoscale topographic features during storage. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering*, 8(8), 478-481.
- Schlisselberg, D. B., y Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiology*, 35(1), 65-72.
- Shikongo-Nambabi, M. N. N. N., Kachigunda, B., y Venter, S. N. (2010). Evaluation of oxidising disinfectants to control *Vibrio* biofilms in treated seawater used for fish processing. *Water SA*, 36(3), 215-220.

- Shikongo-Nambabi, M. N. N. N., Shoolongela, A., y Schneider, M. (2011). Control of bacterial contamination during marine fish processing. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1), 1-17.
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., y Vieira, M. J. (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*, 84(4), 338-345.
- Sofos, J. N. (2009). Biofilms: our constant enemies. *Foodsafety Magazine*.
- Sofos, J. N., y Geornaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157: H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86(1), 2-14.
- Solorzano-Santos, F., y Miranda-Novales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136-141.
- Srey, S., Jahid, I. K., y Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.
- Srey, S., Park, S. Y., Jahid, I. K., y Ha, S.-D. (2014). Reduction effect of the selected chemical and physical treatments to reduce *L monocytogenes* biofilms formed on lettuce and cabbage. *Food Research International*, 62, 484-491.
- Stacy, D. M., Le Quement, S. T., Hansen, C. L., Clausen, J. W., Tolker-Nielsen, T., Brummond, J. W., . . . Blackwell, H. E. (2013). Synthesis and biological evaluation of triazole-containing N-acyl homoserine lactones as *quorum sensing* modulators. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 11(6), 938-954.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C., Wilson, S., y Klapper, I. (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 361-367.
- Tajik, H., Naghili, H., Ghasemahdi, H., Moradi, M., y Badali, A. (2015). Effects of *Zataria multiflora* boiss essential oil, ultraviolet radiation and their combination on *Listeria monocytogenes* biofilm in a simulated industrial model. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 2113-2119.

- Tyagi, S. P., Sinha, D. J., Garg, P., Singh, U. P., Mishra, C. C., y Nagpal, R. (2013). Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An *in vitro* study. *Journal of Conservative Dentistry*, 16(6), 532.
- Vaid, R., Linton, R. H., y Morgan, M. T. (2010). Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. *Food Microbiology*, 27(8), 979-984.
- Valeriano, C., De Oliveira, T. L. C., De Carvalho, S. M., das Graças Cardoso, M., Alves, E., y Piccoli, R. H. (2012). The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*, 25(2), 673-677.
- Van Houdt, R., y Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1117-1131.
- Vankerckhoven, E., Verbessem, B., Crauwels, S., Declerck, P., Muylaert, K., Willems, K., y Rediers, H. (2011). Exploring the potential synergistic effects of chemical disinfectants and UV on the inactivation of free-living bacteria and treatment of biofilms in a pilot-scale system. *Water Science & Technology*, 64(6), 1247-1253.
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D., Mafu, A. A., Jacques, M., y Harel, J. (2014). Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 5(1-12).
- Waal, S. V., Jiang, L. M., Soet, J. J., Sluis, L. W., Wesselink, P. R., y Crielaard, W. (2012). Sodium chloride and potassium sorbate: a synergistic combination against *Enterococcus faecalis* biofilms: an *in vitro* study. *European Journal of Oral Sciences*, 120(5), 452-457.
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., y Zhou, G. (2013). *In situ* characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 293-302.
- Wong, H., Townsend, K., Fenwick, S., Trengove, R., y O'Handley, R. (2010). Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella*

Typhimurium biofilms to disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 2222-2228.

Zengin, H., y Baysal, A. H. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of thyme and clove essential oils and application in minced beef. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1261-1271.