

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EXTRACTOS DE PLANTAS COMO INHIBIDORES DE LA FORMACIÓN
DE BIOPELÍCULA DE *Escherichia coli* O157:H7**

Por

Q.F.B. AZIEL DENIZ ESCOBAR RODRÍGUEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con acentuación
en Microbiología.**

Julio 2010

EXTRACTOS DE PLANTAS COMO INHIBIDORES DE LA
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE
Escherichia coli O157:H7

Comité de Tesis

Director de Tesis: Dr. José Santos García Alvarado.

Secretario: Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna.

Vocal: Dra. Norma Laura Heredia Rojas.

Asesor externo: Dr. Ronald G. Labbé

El Presente Trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, y la asesoría del Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna y el Dr. Ronald G. Labbé. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, Proyecto 105389.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios mío, por haberme concedido llegar hasta este punto, alcanzando mis objetivos llena de felicidad y alegría. Gracias a ti fui fuerte frente a las adversidades de la vida, y gracias a ti aprendí a afrontar y alcanzar cada reto planteado. Gracias Señor por enseñarme día a día que los sueños se pueden alcanzar y que un quiero siempre vendrá acompañado de un puedo.

Quiero agradecer al Dr. José Santos García Alvarado y a la Dra. Norma Laura Heredia Rojas por todo el apoyo y aprendizaje brindado durante mi estancia en su laboratorio, por haberme permitido pertenecer a él; así como por los múltiples mensajes de aliento que me permitieron hacer de mi trabajo un proyecto más completo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Proyecto 105389) por haberme brindado el apoyo económico que hoy me permite obtener este grado.

Gracias Dr. Carlos E. Luna, por todo su apoyo brindado, y por sus acertados consejos hacia mi trabajo.

Gracias a mis padres por haberme dado esta vida que hoy me permite alcanzar mis metas llena de satisfacción y alegría; por sus múltiples mensajes de aliento que me permitieron no dudar de las decisiones tomadas, haciendo de mi un profesional capacitado para enfrentar los problemas que afligen a un mundo que se encuentra en constante cambio.

A los maestros M.C. Sandra, M.C. Eduardo y M.C. Luisa, que siempre estuvieron brindándome su apoyo, el cual ayudó a hacer de este trabajo lo que es.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Mayra y Patricio, las personas más importantes de mi vida, porque sin ellos yo no sería nada, gracias por brindarme una educación plena, que me permite ser lo que soy.

Gracias abuelita Pepita y tía Isabel, a ustedes les debo mi formación como persona, porque ustedes me enseñaron que nada en esta vida puede truncar un sueño.

Gracias a “tí”, porque aunque no estuviste conmigo en gran parte de mi vida, en estos momentos has sido un apoyo importante que hoy me permite alcanzar esta meta.

A mis hermanos, Balde, Iaseli y Luis, chicuelos, que haría yo sin ustedes, siempre apoyándome, aguantándome en mis momentos de locura, y siendo mi apoyo en los fines de semana en los que me quedaba trabajando en el laboratorio, que haría yo sin ustedes.

Alejandro, amor de mi vida, gracias por estar conmigo siempre, apoyándome en mis decisiones y alentándome a superarme cada día más. Gracias por comprender que para alcanzar un sueño se requiere de esfuerzo y apoyo, y tú fuiste el apoyo que me motivó día con día a disfrutar y compartir de todo lo aprendido durante mi preparación.

A mis compañeros de laboratorio: M.C. Eduardo (gracias por su apoyo incondicional, múltiples enseñanzas y por demostrarme que la vida nunca dejará de premiarme), M.C. Sandra (gracias por enseñarme que la vida se puede expresar en una canción), QFB. Mayela (gracias por ser mi ña, que haría yo sin ti), QFB. Nydia (señorina siempre recordándome que existen cosas buenas en este mundo), Ing. Macario, QBP. Juan, Ericka, Armando, Sergio, Wendy e Ivan, siempre los tendré en mi mente, gracias por todo el apoyo, cariño, y atenciones que tuvieron hacia mí, sin ustedes mi estancia no hubiera sido la misma.

A mis mejores amigas de toda la vida, Alejandra, Hortencia y Gabriela, niñas, en cada momento de mi vida ustedes han estado presentes, gracias por brindarme todo su cariño y comprensión, las quiero mucho.

A mis niñas del clan, QFB. Reyna, QFB. Jazmín, QFB. Sandra, QFB. Marisol, QFB. Nubia y QFB. Blanca; siempre al pendiente de mí, gracias por su apoyo y muestra de cariño, por estar conmigo a través de los años, por demostrarme que amistades como ustedes no se encuentran fácilmente, las quiero mucho niñas.

A mis niños: M.C. Pedro, QFB. Allan, QFB. Isaac y QFB. Javier, chicos pude alcanzar mi meta, gracias por apoyarme y estar para mí cada momento de mi vida.

Y a todas las demás personas que indirectamente colaboraron en la realización de mi trabajo, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA.....	v
TABLA DE CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. HIPÓTESIS	5
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo general	6
3.2 Objetivos particulares	7
4. ANTECEDENTES.....	8
4.1 Enfermedades transmitidas por alimentos	8
4.2 Generalidades de los tipos patogénicos de <i>E. coli</i>	9
4.3 <i>E. coli</i> O157:H7.....	11
4.4 Producción de biopelícula.....	14
4.5 Motilidad “swarming”	18
4.6 Importancia de los genes con respecto a patogenicidad	22

4.7 Métodos de control de microorganismos	23
4.8 Uso de plantas generalidades	27
5. MÉTODOS	33
5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	33
5.2 Plantas utilizadas	34
5.3 Obtención de los extractos	36
5.4 Determinación del peso seco.....	36
5.5 Ensayo preliminar de susceptibilidad microbiana.....	36
5.6 Determinación de la concentración mínima bactericida.....	37
5.7 Determinación de la concentración mínima bactericida de un coctel de cepas de <i>E. coli</i> O157:H7.....	39
5.8 Determinación de la concentración mínima bactericida de una mezcla comercial Citrol K-Ultra.....	39
5.9 Determinación del efecto de las concentraciones subletales sobre el crecimiento microbiano.....	39
5.10 Determinación de la combinación efectiva de los extractos activos.....	40
5.11 Efecto de los extractos sobre la formación de biopelícula.....	42
5.12 Determinación de swarming.....	43
5.13 Determinación colorimétrica de grupos químicos	43
5.13.1 Hidrocarburos insaturados	43
5.13.2 Saponinas	44
5.13.3 Flavonoides	44
5.13.4 Sesquiterpenlactonas	44
5.13.5 Carbohidratos	44
5.13.6 p-benzoquinonas.....	45
5.13.7 Alcaloides.....	45
5.13.8 Cumarinas	45
5.13.9 Aldehídos y cetonas	45
5.13.10 Cloruros.....	46
5.13.11 Taninos.....	46
5.14 Análisis estadísticos	46
6 RESULTADOS.....	47
6.1 Susceptibilidad antimicrobiana	47
6.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida.....	50
6.3 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida de un coctel de cepas de <i>E. coli</i> O157:H7	51
6.4 Determinación del efecto de concentraciones subletales sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7	51
6.5 Determinación de combinación efectiva de los extractos de <i>C. limon</i> y <i>L. graveolens</i> sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7...53	53

6.6 Efecto del extracto de <i>C. limon</i> y <i>L. graveolens</i> sobre la formación de biopelícula	55
6.7 Determinación de swarming.....	59
6.8 Caracterización parcial de compuestos químicos.....	63
7 DISCUSIÓN	65
8 CONCLUSIONES	72
LITERATURA CITADA.....	73
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	97

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Variables importantes en el ataque celular y la formación de biopelícula.....	16
2. Nombre común y científico, así como partes de las plantas utilizadas	34
3. Uso de microplacas. Contenido de los pozos.....	38
4. Esquema general de las mezclas realizadas	41
5. Efecto sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 de los extractos acuosos,etanólicos y metanólicos de diferentes plantas	48
6. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida de los extractos elegidos	50
7. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida de un coctel de cepas de <i>E. coli</i> O157:H7.....	51
8. Índice fraccionario de concentración bactericida para <i>E. coli</i> O157:H7 de la mezcla de los extractos elegidos.....	53

9.	Determinación colorimétrica de grupos químicos presentes en los extractos elegidos	63
----	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Etapas en el proceso de formación de biopelícula.....	15
2. Estados de comportamiento multicelular swarming.....	19
3. Efecto de concentraciones subletales sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7	52
4. Concentración Fraccionaria Bactericida de la combinación de <i>C.</i> <i>limón</i> y <i>L. graveolens</i> que inhiben a <i>E. coli</i> O157:H7	54
5. Formación de biopelícula de <i>E. coli</i> O157:H7 a concentraciones subletales de <i>C. limón</i> y <i>L. graveolens</i>	56
6. Formación de biopelícula de <i>E. coli</i> O157:H7 en una mezcla de <i>C. limón-L. graveolens</i>	57
7. Imagen visual de la formación de biopelícula de <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	58
8. Efecto de los extractos de <i>C. limon</i> y <i>L. graveolens</i> sobre la formación de swarming de <i>E. coli</i> O157:H7	60

Figura	Pág.
9. Efecto de la combinación de <i>C. limon</i> – <i>L. graveolens</i> sobre la formación de swarming de <i>E. coli</i> O157:H7	61
10. Imagen visual del swarming de <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894.....	62
11. Caracterización parcial de compuestos químicos presentes en los extractos elegidos.....	64

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

C.M.B	Concentración Mínima Bactericida
°C	Grados Celsius
g	Gramo (s)
h	Hora (s)
l	Litro (s)
Log UFC/ml	Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
<	Menos que
>	Mayor que
≤	Menor o igual que
≥	Mayor o igual que
μ	Micra (s)
μl	Microlitro (s)
mg	Miligramo (s)
mg/ml	Miligramo por mililitro (s)
mg/l	Miligramo por litro (s)
M	Molaridad
N	Normalidad
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
—	Negativo
+	Positivo
pH	Potencial de Hidrógeno
%	Porcentaje
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
v/v	Volumen/Volumen

RESUMEN

Escherichia coli patogénica es uno de los principales microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales capaz de desarrollar biopelículas (comunidades de bacterias que viven fijándose a las superficies) en productos como carne de res, vegetales y agua. Este hecho facilita la contaminación, sobrevivencia y prevalencia del patógeno en estos productos. Actualmente se ha visto que *E. coli* O157:H7 forma biopelículas sobre alimentos en los cuales anteriormente no proliferaba; y debido a que éstas son difíciles de erradicar y presentan resistencia a la mayoría de los agentes desinfectantes, los productos alimenticios pueden llegar a los consumidores con un alto nivel de contaminación, trayendo consigo un auge en los brotes de infecciones causadas por este microorganismo. En esta investigación se evaluó la actividad antimicrobiana de diversos extractos de plantas comestibles y mezclas de los mismos sobre el crecimiento y la formación de biopelícula por *E. coli* O157:H7; se seleccionaron dos plantas las cuales tuvieron una concentración mínima bactericida (CMB) de 3 y 1.5 mg/ml respectivamente. Se probaron concentraciones subletales (25, 50 y 75% del CMB) de estos extractos sobre la viabilidad bacteriana y no encontramos ningún efecto inhibitorio del crecimiento; sin embargo, produjeron una disminución de la formación de biopelícula. Se analizaron mezclas de estos extractos, encontrando que la formación de biopelícula se vio disminuida dependiendo de la concentración de extracto utilizada. Entre los grupos químicos presentes en los extractos destacaron los flavonoides y taninos, los cuales pudieran ser los responsables del efecto antimicrobiano e inhibidor de biopelícula producida por *E. coli* O157:H7.

ABSTRACT

Pathogenic *Escherichia coli* are major gastrointestinal disease-causing organisms capable of developing biofilms (communities of bacteria usually attached to surfaces) in products such as meat, vegetables and water. Biofilms facilitates the contamination, survival and prevalence of the pathogen in these products. *E. coli* O157: H7 biofilms are difficult to eradicate and are resistant to most disinfectants. Consumers acquiring food products with high levels of contamination are at risk of infections caused by this organism. In this study the antimicrobial activity of different extracts of edible plants and mixtures was evaluated on the growth and biofilm formation of *E. coli* O157: H7. Two plants were selected which had a minimum bactericidal concentration (MBC) of 3 and 1.5 mg/ml respectively. Sublethal concentrations were tested (25, 50 and 75% of the MBC) of these extracts on bacterial viability and no inhibitory effect was found on growth, however, a decrease in biofilm formation was produced. Mixtures of these extracts were analyzed, and found that biofilm formation was decreased depending on the concentration of extract used. Among the principal chemical groups present in the extracts flavonoids and tannins were detected, which could be responsible for the antimicrobial effect and inhibition of biofilms produced by *E. coli* O157: H7.

1. INTRODUCCIÓN

El consumidor juega un importante papel en la demanda de productos alimenticios. Últimamente la demanda ha aumentado con respecto a los productos “naturales”, libres de aditivos sintéticos, lo cual ha llevado a la búsqueda de antimicrobianos naturales a fin de validar científicamente el uso y aplicación de compuestos alternativos para el control de patógenos contaminantes de alimentos.

Entre este tipo de compuestos se han estudiado a los extractos de plantas, debido a su bajo costo y mayor disponibilidad en el mercado. En base a esto, el campo de aplicación es muy grande, ya que se estima que se han aislado sólo alrededor de 12,000 compuestos procedentes de organismos vegetales, lo cual constituye aproximadamente a sólo el 10% de los metabolitos secundarios existentes en plantas superiores. Los compuestos químicos más importantes con actividad antimicrobiana, obtenidos de plantas incluyen a fenoles simples, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides (Domingo y López, 2003).

E. coli O157:H7 fue el primer patógeno identificado como responsable de dos brotes de colitis enterohemorrágica en 1982 (Ryu and Beuchat, 2005), en los cuales la carne de res mal cocida fue implicada como vehículo principal del patógeno. Sin embargo, otros brotes han sido asociados con el consumo de rábanos, alfalfa, lechuga y jugo de manzana no pasteurizado (Ryu and Beuchat, 2004).

Se conoce que *E. coli* O157:H7 forma una biopelícula compuesta de células embebidas en una matriz de exopolisacáridos (EPS) y adheridas a una superficie inerte. Estos EPS son responsables de brindar protección a las células contra el estrés ambiental (Frank, 2003; Weiner *et al.*, 1995). Las biopelículas se pueden formar en las superficies de los contenedores usados para cosechar, transportar y vaciar alimentos a distintos niveles (Costerton, 1995; Blackman and Frank, 1996; Gabis and Faust, 1988); además de crecer sobre las superficies de los alimentos (Carmichael *et al.*, 1999; Cooley *et al.*, 2003; Fett, 2000).

Existen reportes sobre compuestos naturales con actividad inhibitoria de biopelícula, entre los que podemos mencionar al extracto acuoso de *Ballota nigra* y el extracto etanólico de *Junglans regia* (nuez), los cuales inhiben la formación de biopelícula de *S. aureus*.

En este estudio se determinaron las propiedades inhibitorias del desarrollo de la biopelícula producida por *E. coli* O157:H7 mediante extractos de plantas comestibles; así como la identificación de grupos funcionales que pudieran ser responsables de la actividad antimicrobiana e inhibitoria de biopelícula.

2. HIPÓTESIS

Algunos extractos de plantas son capaces de inhibir la formación de la biopelícula de *E. coli* O157:H7 *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Establecer el efecto inhibitorio de extractos de plantas sobre la formación de biopelícula por *E. coli* O157:H7.

3.2 Objetivos particulares.

1. Determinar la efectividad de extractos de plantas sobre la viabilidad de *E. coli* O157:H7.
2. Establecer la CMB (Concentración Mínima Bactericida) de los extractos más activos contra la *E. coli* O157:H7.
3. Determinar el efecto inhibitorio de los extractos de plantas seleccionados contra la formación de biopelícula de *E. coli* O157:H7.
4. Analizar mezclas de los extractos más efectivos sobre la viabilidad de *E. coli* O157:H7 y la formación de biopelícula.
5. Determinar los principales grupos químicos presentes en los extractos que mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de *E. coli* O157:H7.

4. ANTECEDENTES

4.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) de origen microbiano, son causadas por el consumo de agua o alimentos contaminados por microorganismos patógenos, o sus toxinas. La contaminación de los alimentos puede ser endógena, o bien ocurrir en algún punto de su transformación por tanto, el agente etiológico debe estar presente en los animales, vegetales o medio ambiente donde se almacena, maneja o procesa dicho alimento (Parrilla *et al.*, 1993).

Generalmente los microorganismos patógenos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, y deben de encontrar en ellos las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir la suficiente toxina para causar la enfermedad (Parrilla *et al.*, 1993).

En los Estados Unidos, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC/EUA) hicieron un análisis de la información de múltiples sistemas de vigilancia y estimaron que tan solo en ese país se producen 76 millones de casos de ETAs, 325,000 hospitalizaciones y 5,020 muertes por año (CDC, 1999).

4.2 Generalidades de los tipos patogénicos de *E. coli*.

E. coli es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, y fue primeramente descrita hace más de 100 años, por Theodore Escherich (Griffin and Tauxe, 1996). Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no formador de esporas. Tiene la habilidad de fermentar una variedad de azúcares, pero la fermentación de la lactosa con producción de ácido y gas es característica (Feng, 2001).

E. coli, es un habitante normal del tracto digestivo de todos los animales, incluyendo a los humanos. Además está bien documentada que su presencia es benéfica para el cuerpo, ya que ayuda en la síntesis de vitaminas; además de que compite con las bacterias patógenas presentes en el agua y alimentos ingeridos (Feng, 2001). Sin embargo, existe una pequeña cantidad de cepas que son patógenas para el hombre (Nataro and Kaper, 1998).

En relación con su estructura antigénica, *E. coli* presentan antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y en las fimbrias (F) (Edwards and Ewing, 1972; Lior, 1996)). Una combinación específica de antígenos O y H definen el serotipo) al que pertenece el organismo (Whittam *et al.*, 1993).

Las cepas patógenas están agrupadas en seis grupos patogénicos: a) *E. coli* enterotoxigénica (ECET), b) *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), c) *E. coli* enteropatógena (ECEP), d) *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), e) *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg) y f) *E. coli* enteroadherente-difusa (ECAD).

- a) *E. coli* enterotoxigénica (ECET). Este grupo se caracteriza por ocasionar diarrea en personas que estuvieron en países en desarrollo (diarrea del viajero). Esta bacteria se caracteriza por la producción de enterotoxinas, las cuales inducen la secreción de agua y electrolitos dentro del lumen intestinal, de manera similar a *V. cholerae*. Las enterotoxinas son del tipo termo lábil (LT) y termoestable (ST),

y colonizan a nivel del intestino delgado mediante adhesinas fimbriales; por lo que esta bacteria no es invasiva (Darfeuille-Michaud, 1990).

- b) *E. coli* enteroinvasiva (ECEI). Esta bacteria causa la disentería bacilar, con un cuadro similar al provocado por *Shigella*, la cual comparte genes de virulencia con *E. coli*. ECEI puede invadir y proliferar en las células epiteliales de la mucosa del colon, llegando a matar las células. Clínicamente se caracteriza por la presencia de sangre y moco en las heces, acompañado de calambres abdominales, vómito, fiebre y malestar general en los pacientes infectados (Griffin, 1995).
- c) *E. coli* enteropatógena (ECEP). Es el grupo causante del mayor índice de casos de diarrea infantil en los países en desarrollo. Se caracteriza por la producción de la proteína intimina, una adhesina tipo no fimbrial la cual media la adhesión a la mucosa intestinal. Causa diarrea acuosa o sanguinolenta, la cual se asocia a la adhesión (Nisa, 1998). Produce características histopatológicas similar a la ECEH, conocida como lesión de fijación y borramiento; la cual es esencial para una completa patogenicidad (Frankel, 1998; Hartland, 1999).
- d) *E. coli* enterohemorrágica (ECEH). Las características clínicas de este grupo incluyen náuseas, dolor abdominal, diarreas, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y trombocitopenia púrpura. Producen verotoxinas las cuales son el factor de virulencia más importante.
- e) *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg). Este grupo se asocia con la diarrea aguda y persistente en niños. Esta bacteria no secreta enterotoxinas y se caracteriza por la producción de una estructura denominada fimbria de adherencia agregativa, la cual al adherirse a las células intestinales induce un acortamiento de las vellosidades, necrosis hemorrágica y una respuesta inflamatoria, produciendo una estimulación de la secreción mucosa manifestada por diarrea acuosa con moco y fiebre (Griffin, 1995).
- f) *E. coli* adherente-difusa (ECAD). Estudios recientes involucran a esta cepa como el agente causal de diarreas en niños; en donde la susceptibilidad a este

patógeno es edad dependiente (Baqui *et al.*, 1992). Este grupo se caracteriza clínicamente por la presencia de diarrea acuosa sin sangre o leucocitos fecales (Poitrineau *et al.*, 1995).

4.3 *E. coli* O157:H7.

E. coli O157:H7 pertenece al grupo de las ECEH, es fenotípicamente única, ya que no fermenta el sorbitol (SOR) en 24 hr y es negativa para la actividad de β -glucoronidasa (GUD) (Feng, 2001).

E. coli O157:H7 fue primeramente reconocida como un patógeno entérico en 1982. Desde entonces ha sido bien caracterizada en los laboratorios como el causante de diarreas, colitis hemorrágicas, y complicaciones como el síndrome urémico hemolítico (HUS) y la trombocitopenia trombótica purpúrea en niños y en otros grupos de individuos susceptibles (Ryu and Beuchat, 2005).

Durante el 2006, se reportaron múltiples brotes en Estados Unidos provocados por este serotipo, entre los que destacan los reportados en 26 estados de EUA, ligado al consumo de espinacas, produciéndose 205 casos confirmados, 103 pacientes hospitalizados, en donde el 30% desarrollaron HUS y 3 muertes. En noviembre de ese mismo año, el CDC reportó un nuevo brote ligado al consumo de lechuga que abarcó estados de ese país, en donde de 71 casos confirmados, 53 (74%) pacientes tuvieron que ser hospitalizados y 8 (15%) desarrollaron HUS. Una característica de los serotipos O157:H7 aislados de estos brotes fue que presentaron alta resistencia a condiciones de estrés y tenían la capacidad de formación de biopelícula (Uhlich *et al.*, 2008).

Desafortunadamente los brotes producidos por este microorganismo son relativamente frecuentes. En julio del 2008 se reportó la presencia de un multibrote asociado a *E. coli* O157:H7, en donde 49 casos fueron confirmados y todos fueron involucrados al consumo de carne molida de la marca Kroger® Beef (CDC, 2008). Posteriormente, en junio del 2009 se reportaron 72 personas infectadas por esta bacteria, las cuales involucraban el consumo de masa para galletas pre envasada y refrigerada de la marca Nestlé Toll House. Un mes después, fueron reportados 17 casos de infecciones confirmados, en donde el vehículo de contaminación fue la carne de res de la compañía JBS Swift Beef (CDC, 2009).

En octubre del 2009, se produjo en Estados Unidos un brote provocado por el consumo de productos cárnicos de la granja Fairbank contaminados con *E. coli* O157:H7; el cual afectó a 25 personas, de las cuales 16 requirieron hospitalización, 3 desarrollaron HUS (Síndrome urémico hemolítico) y 2 pacientes murieron (CDC, 2009).

En los últimos años se ha reportado a *E. coli* O157:H7 como una de las bacterias más frecuentes aisladas de muestras de rutina, incluso más que *Shigella* spp., ocupando el segundo de los tres más frecuentes patógenos aislados después de *Campylobacter* y/o *Salmonella* spp. (Griffin, 1995; Park *et al.*, 1994).

El principal factor de virulencia, que define al grupo de *E. coli* enterohemorrágica es la producción de Shiga-toxinas, de la cual existen dos tipos Stx₁ y Stx₂ (Beutin *et al.*, 2004; Smith and Fratamico, 2005); estas citotoxinas son esencialmente idénticas tanto genética como proteicamente a la Stx producida por *Shigella dysenteriae*. Se ha establecido que la Stx es el factor detonante que conduce a cuadros muy severos, complicaciones e incluso la muerte (Calderwood *et al.*, 1996; Karmali *et al.*, 1996; O'Brien and Holmes, 1987, 1996; O'Brien *et al.*, 1992; Sears and Kaper, 1996; Tesh and O'Brien, 1991).

Además, se ha establecido que *E. coli* O157:H7 es más sensible al calor que *Salmonella* cuando se encuentra en bajos niveles en carne. Su crecimiento óptimo es de 37°C, sin embargo el rango de temperatura en donde puede crecer varía entre 8 a 10°C (Buchanan and Doyle, 1997).

E. coli O157:H7 se adhiere a los enterocitos de humanos y lesiona sus microvellosidades. La secuencia del proceso patogénico según los conocimientos actuales involucra la adherencia laxa al enterocito mediante la fimbria, seguida de adherencia íntima y finalmente lesión de la pared del enterocito por producción de la proteína intimina y posterior liberación de verotoxina. La dosis infectante mínima es baja; se estima entre 10^3 y 10^2 bacterias (Margall *et al.*, 1997).

Las características clínicas de la infección por *E. coli* O157:H7 involucra un cuadro clínico de enteritis hemorrágica afebril, asociada con frecuencia a dos graves complicaciones, el síndrome urémico hemolítico (SHU) y la púrpura trombótica trombocitopénica (PPT) (Margall *et al.*, 1997), provocando también en ocasiones brotes epidémicos importantes (Griffin *et al.*, 1991).

La infección se transmite vía fecal –oral y el vehículo más frecuente es la carne de bovino, fundamentalmente cuando están mal cocidas. También se han documentado como vehículos de este patógeno la carne de pavo, salami, leche, yogurt, mayonesa, ensaladas, vegetales crudos y agua (Griffin *et al.*, 1991). Puede ocurrir contaminación cruzada en las plantas procesadoras de alimentos y durante el subsecuente manipuleo y preparación de éstos, resultando en un alto rango de alimentos que han sido implicados en brotes de infección (Mead *et al.*, 1999).

E. coli O157:H7 es resistente a las temperaturas extremas y a los ácidos débiles. La atomización de ácidos calientes ha demostrado ser inefectiva para la descontaminación de carnes. El mecanismo de tolerancia a los ácidos parece estar asociado con las proteínas que pueden ser inducidas por la pre-exposición de la bacteria a condiciones ácidas (Doyle *et al.*, 1997).

4.4 Producción de biopelícula.

Una biopelícula puede ser definida como una comunidad bacteriana de células y polímeros extracelulares que viven fijándose una a otra y a superficies (Costerton, 1995). La fijación y formación de biopelícula por patógenos y microorganismos esporulados en plantas procesadoras son importantes para la salud pública y están relacionadas con contaminación cruzada de alimentos (Holah *et al.*, 1990; Jones, 1994; Sommer, 1999).

Las superficies en las que se puede desarrollar la biopelícula en las plantas de alimentos incluyen el acero inoxidable, aluminio, vidrio, materiales de nylon y teflón (Deibel; 2000). La capacidad de unirse depende de las proteínas específicas de su cubierta y de los apéndices motrices (Pederson, 1990)

Las biopelículas bacterianas son estructuras complejas de una arquitectura dinámica, las cuales se desarrollan en algunas superficies bióticas y abióticas. Pueden estar formadas por organismos de la misma especie o especies diferentes. Ambas son consideradas la forma de vida ubicua más abundante en la naturaleza (Cordula *et al.*, 2006).

La biopelícula bacteriana comienza a formarse cuando una célula individual se une inicialmente a una superficie. La capacidad de la célula para realizar este contacto inicial depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican para funciones motrices, sensibilidad ambiental, adhesinas y otras proteínas (Piera Serra, 2003). Reportes previos han demostrado que el flagelo juega un papel importante en la formación temprana de biopelícula en diversas bacterias Gram negativas (Lemon *et al.*, 2007).

Después de la unión inicial, la célula empieza a crecer y a esparcirse sobre la superficie formando una monocapa, compuesta de microcolonias. Mientras tanto, las células cambian su comportamiento y dan lugar a una compleja arquitectura de la biopelícula madura. El más evidente de estos cambios es la producción de una matriz

de exopolisacáridos (EPS) que adhiere a todo el conjunto. Mientras la biopelícula va creciendo suceden otros cambios. Si las condiciones ambientales lo permiten, se puede extender hacia áreas no infectadas o liberar algunas células, que recuperan las cualidades planctónicas originales (Costerton, 1995; O'Toole, 2000; Kraigsley *et al.*, 2002).

Se han identificado cinco fases en la formación de biopelículas: 1) Adsorción reversible de la bacteria a la superficie, 2) Unión irreversible, 3) Primera fase de maduración con crecimiento y división de las células individuales, 4) Segunda fase de maduración con producción del exopolímero, y 5) Desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras (Figura 1. Danese *et al.*, 2000).

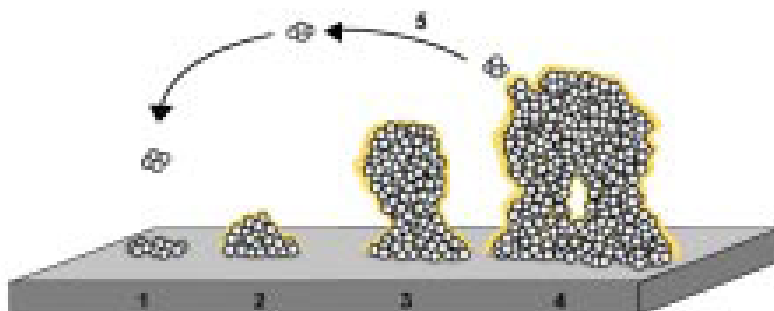


Figura 1. Etapas en el proceso de formación de una biopelícula bacteriana.

La composición del exopolímero es poco conocida, pero consta de polisacáridos o glicoproteínas de diversos azúcares, como glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina y otros. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos o teicoicos (Chmielewski and Frank, 2003).

Algunos factores son críticos para la formación de biopelícula, entre ellos podemos mencionar al flagelo, la motilidad y/o quimiotaxis (Tabla 1. Lawrence *et al.*, 1987; Korber *et al.*, 1989; 1994; DeFlaun *et al.*, 1994; Graf *et al.*, 1994; Mills and Powelson, 1996; Vidal *et al.*, 1998), fimbrias (Donlan, 2002), etc.

TABLA 1.

VARIABLES IMPORTANTES EN EL ATAQUE CELULAR Y LA FORMACIÓN DE BIOPÉLÍCULA

Propiedades del sustrato	Propiedades del fluido	Propiedades de la célula
Textura o rugosidad	Velocidad del flujo	Hidrofobicidad de la superficie celular
Hidrofobicidad	pH	Fimbria
Condiciones de la película	Temperatura Cationes Presencia de agentes antimicrobianos	Flagelo Sustancias poliméricas extracelulares

E. coli O157:H7 tiene la capacidad de producir EPS, los cuales le sirven de barrera física para proteger a las células contra el estrés ambiental. Estos EPS se encuentran involucrados en el proceso de adhesión celular y formación de biopelícula (Frank, 2003; Weiner *et al.*, 1995).

Las propiedades que tienen las biopelículas que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos incluyen la dificultad mecánica del antimicrobiano para penetrar la biopelícula, la actividad metabólica de las células de la biopelícula y la composición de la biopelícula (Parsek and Fuqua, 2004). Sin embargo, existen métodos reportados como efectivos para lograr la remoción de estas, tales como una limpieza larga y exhaustiva con detergentes alcalinos formulados con agentes quelantes, (Dunsmore, 1981).

Para facilitar el estudio de las biopelículas, se han desarrollado una variedad de métodos de observación directa e indirecta (An and Friedman, 2000).

Los métodos indirectos incluyen sonicación y conteo estándar en placa; que consisten en separar a los microorganismos de las superficies para posteriormente contarlos. Otros métodos indirectos (radiomarcaje bacterial, ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas, y procedimientos de microtitulación) estiman el número de organismos que atacan *in situ* (An and Friedman, 2000).

Los métodos que involucran la observación directa, incluyen las técnicas de microscopía (luz, escaneo con láser confocal, transmisión de electrones, y escaneo por microscopía electrónica), que permiten observar directamente la colonización microbial. Se ha reportado que la técnica de microscopía epifluorescente, muestra datos por subestimación de los niveles de biopelícula, dado que el grosor no es medido, y sobreestima las áreas cubiertas por células, ya que algunos polímeros extracelulares son teñidos (Blackman and Frank, 1996).

La tinción con cristal violeta (CV), es un método colorimétrico el cual se basa en la medición óptica de la cantidad de colorante requerido para teñir la biopelícula. Se han reportado múltiples aplicaciones para esta técnica, incluyendo ensayos de búsqueda para mutantes deficientes en la adhesión a la superficie (O'Toole and Kolter, 1998; Pitts *et al.*, 2003; Pratt and Kolter, 1998).

Así como se ha estudiado los factores que influyen en la formación de las biopelículas, investigadores han estado trabajando en la búsqueda de compuestos antibiopelículas presentes en aceites esenciales de plantas con actividad inhibitoria del crecimiento microbiano. En estos casos, el ensayo de CV ha sido modificado, a fin de medir el conjunto relativo de biopelícula formada con respecto al total de crecimiento, ya que el CV se une proporcionalmente a la biomasa. Sin embargo, se ha reportado que existen algunos factores físicos y biológicos que pueden influenciar la unión del colorante a la biopelícula, tales como factores estructurales que afectan la difusión en seco, diferencias morfológicas y fisiológicas en células individuales que influyen la unión en seco, e interacciones químicas entre los componentes de los aceites esenciales y el CV (Niu and Gilbert, 2004).

4.5 Motilidad “swarming”.

Swarming es una forma de motilidad bacterial flagelo-dependiente que facilita la migración de bacterias en substratos viscosos, como las superficies de agares semisólidos (Harshey, 2003).

Existe para ambos tipos de bacterias, Gram positivas y Gram negativas, y muchas especies han mostrado exhibirla (Allison and Hughes, 1996).

El orden para que se produzca consiste primeramente en una diferenciación de las células a un estado especializado (células swarming); caracterizado por un incremento en el número de flagelos y la elongación de las células; las cuales realizan un movimiento de ráfaga multicelular a través de superficies (Fraser and Hughes, 1999; Harshey and Matsuyama, 1994; Harshey, 2003).

El swarming consta de tres estados (Figura 2):

- i) Reconocimiento de señales ambientales apropiadas dando como resultado la formación de células swarming elongadas e hiperflageladas. Cuando las células son inoculadas en la superficie del agar, inicialmente se forman colonias regulares. Después, las células de la periferia de las colonias se diferencian en una forma alargada, multinucleada, septada e hiperflagelada (célula swarm), debido a la activación de la producción de flagelos y la represión de la septación celular (Allison and Hughes, 1991; Eberl *et al.*, 1999).
- ii) Movimiento coordinado de células swarming. Éste proceso envuelve el movimiento de células swarm altamente flageladas y elongadas como grupos de balsas en la superficie del agar; el contacto célula-célula es esencial para este tipo de migración (Eberl *et al.*, 1999).
- iii) Consolidación de células vegetativas e iniciación de un nuevo grupo de swarming. Después del período de migración, las células swarm bajo consolidación presentan una reversión a células vegetativas pequeñas y

normalmente flageladas. Estas células son capaces de reiniciar fuertes ciclos de diferenciación swarming y migración, subiendo a las zonas concéntricas de la superficie del agar (Williams and Schwarzhoff, 1978; Allison and Hughes, 1991).

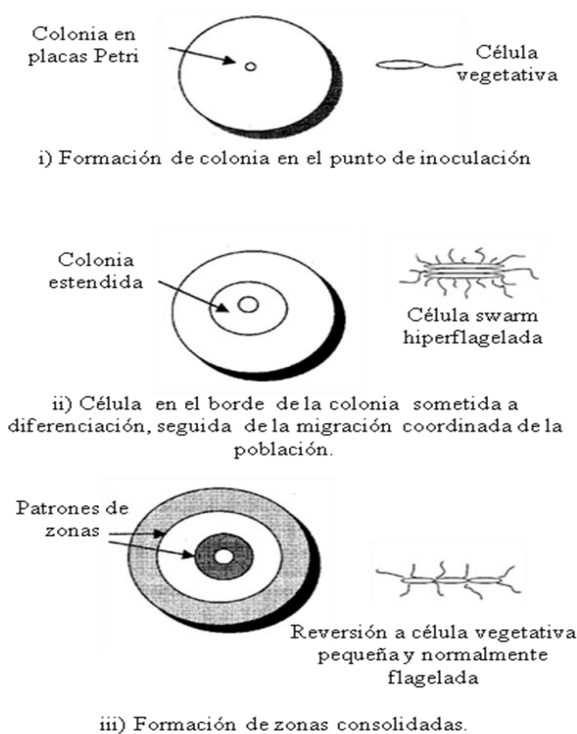


Figura 2. Estados de comportamiento multicelular swarming.

Las células swarming presentan un cambio morfológico, en el cual se produce un material extracelular (agentes humectantes), como surfactantes y exopolisacáridos, que incrementan la humedad de la superficie y facilitan el movimiento (Harshey, 2003). En algunos organismos el estado de células swarming puede estar asociado con la patogénesis (Otterman and Miller, 1997).

Ciertas propiedades físicas contribuyen al contexto de swarm: la masa del swarm que ejerce estrés en el substrato del agar, el cual puede ser censado por las células, respondiendo a la elasticotaxis (capacidad bacteriana de sentir y responder a las fuerzas elásticas de un gel de agar sobre el que se encuentran; la célula reorienta su

eje de manera perpendicular a la fuerza de tensión, Dworkin, 1983; Fontes and Kaiser, 1999); la matriz de EPS generada por el swarm, la cual es requerida para una motilidad normal (Kaiser, 2004; Shimkets, 1990); y el quórum sensing y el contacto de señalización célula-célula que necesita un grupo de células en cercana proximidad, donde se conoce que se altera la conducta celular individual (Kaiser, 2004).

Diferentes estudios se han realizado a través del tiempo para determinar los factores responsables del swarming. Se ha encontrado que el flagelo, la quimiotaxis y los compuestos extracelulares (limo) juegan un rol importante en este tipo de comportamiento (Allison *et al.*, 1992; Jessica *et al.*, 1992).

Papel del flagelo. La motilidad swarming es dirigida por un movimiento de flagelos arreglados períticamente, los cuales funcionan como hélices dirigidos por un motor rotatorio (Hazelbauer *et al.*, 1993).

Papel de la quimiotaxis. El sistema funcional de quimiotaxis es esencial para el movimiento en remolino que es característico del swarming. Lominski y Lendrum (1947) establecieron el término “teoría de quimiotaxis negativa”, en la cual las células crecen activamente y se dividen en la colonia central produciendo y excretando un metabolito tóxico que se difunde en el agar, estableciéndose una disminución gradual de la concentración fuera de la colonia. Cuando la concentración del metabolito alcanza un nivel crítico, ocurre la estimulación de la formación de células swarm, por inhibición de la división celular y simultáneamente la síntesis flagelar. Las células swarm una vez formadas, son hábiles para detectar el producto tóxico y moverse lejos de la colonia central y debajo del gradiente en una respuesta quimiotáctica negativa (Williams and Schwarzhoff, 1978).

Rol del compuesto extracelular. Varias especies bacterianas tienen la habilidad de producir un compuesto extracelular que ayuda en la migración de las células swarm sobre la superficie del agar. Se ha establecido que las células swarm de *P. mirabilis* producen una gran cantidad de material extracelular (polisacáridos ácidos)

que forman una matriz entre las células adyacentes y los encapsulados de agregados celulares (Stahl *et al.*, 1983; Lindum *et al.*, 1998).

El factor crítico para que las células nadadoras se diferencien en células swarm o en colonias de forma regular es la concentración y viscosidad del agar en donde se encuentran. En un medio que contenga una baja concentración de agar (menos del 0.4%), los organismos exhiben una motilidad swimming, mientras que un medio solidificado con 0.4-1.2% de agar (óptimo 0.7%), el organismo muestra swarming solo en la parte superior del agar. Un fuerte incremento en la concentración de agar en el medio resulta en la inhibición de la migración de los organismos (Eberl *et al.*, 1999).

Cuando *E. coli* es inoculada cercanamente al centro de una caja de Petri conteniendo agar nutritivo semisólido, se produce swarm en bandas concéntricas. Esta forma de bandas es debida a la respuesta quimiotáctica al gradiente espacial generado por el transporte y el metabolismo bacteriano (Adler, 1966).

Se ha encontrado que la comunicación celular, basada en inductores químicos densidad-dependientes denominado quórum sensing, es importante para el comportamiento multicelular como el swarming (Eberl *et al.*, 1996).

Las células swarm tienen la habilidad de promover la infección en el hospedero (Alberti and Harshey, 1990). Muchas líneas de investigación soportan la idea de que la virulencia y la motilidad están cercanamente relacionadas con la patogenicidad bacteriana (Ottemann and Miller, 1997); el sistema flagelar/quimiotáctico y su mecanismo molecular envuelven la secreción de factores de virulencia (Ghelardi *et al.*, 2002).

El aceite esencial de clavo ha mostrado ser eficaz para inhibir la motilidad swarming de *P. aeruginosa* dependiendo de la concentración empleada (Khan *et al.*, 2009).

Recientes estudios han mostrado que las furanonas aisladas del alga *Delisea pulchra* afectan la formación de swarming en *Proteus mirabilis* (Gram *et al.*, 1996). Este mismo compuesto inhibe completamente la formación de swarming en *B. subtilis* a una concentración de 52 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Ren *et al.*, 2002).

El resveratrol (fitoalexina de origen natural producida por las plantas bajo condiciones de estrés ocasionadas por el ataque por patógenos) inhibe completamente el swarming de *P. mirabilis* a una concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Wang *et al.*, 2006).

4.6 Importancia de los genes con respecto a patogenicidad.

En la mayoría de las interacciones entre patógeno y hospedero, el desarrollo de la enfermedad requiere de la expresión coordinada de un grupo de genes en respuesta a varias señales ambientales (Cotter and Miller, 1998); pudiendo ser regulados sólo a nivel transcripcional y post-transcripcional (Liaw *et al.*, 2003).

Diversos estudios han mostrado que una variedad de procesos microbianos como el crecimiento, esporulación, producción de toxinas, virulencia, síntesis de antibióticos y motilidad en las células bacterianas, son coordinadamente regulados a nivel de expresión genética por una variedad de moléculas autoinductoras en un proceso denominado quórum sensing (Sperandio *et al.*, 2003; Xavier and Bassler, 2003; Pillai and Jesudhasan, 2007).

Existen varios tipos de moléculas autoinductoras, de las cuales la AI-2 ha sido considerado como la molécula universal de señalización (Xavier and Bassler, 2003). Del genoma completo de *E. coli* solo del 5 al 10% de los genes son controlados por moléculas AI-2 (DeLisa *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2001).

En *E. coli* la síntesis y secreción de hemolisina son determinados por el operon *hly*, mientras que el gen *hha* está involucrado en la producción de la proteína que

regula la hemolisina (Jubete *et al.*, 1995). La hemolisina es el producto celular que incrementa la virulencia de las cepas de *E. coli* ECEH (Brauner *et al.*, 1995).

El gen *yadK* está involucrado en las funciones de movilidad, secreción y adhesión (Welch *et al.*, 2002). También existen otros genes que se encuentran relacionados con las proteínas que codifican para el exoesqueleto (fimbria, flagelo y curli), como los genes *yadN*, *crl*, *yehA*, *fliP*, y *flgN* (DeLisa *et al.*, 2001).

Actualmente, se han publicado trabajos relacionados con el quórum sensing (QS) a nivel molecular (Waters and Bassler, 2005; Walters and Sperandio 2006). Sin embargo, apenas comienza a reconocerse la importancia del QS en alimentos (Bruhn *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004, 2005; Widmer *et al.*, 2007); esto debido a que se ha observado que la comunicación entre bacterias pueda ser potencializada o reprimida dependiendo de la composición típica del alimento (Pillai and Jesudhasan, 2007).

Es por esta razón, que actualmente se trata de elucidar la magnitud en la que los productos naturales pueden influenciar la regulación genética de la virulencia en microorganismos patógenos.

4.7 Métodos de control de microorganismos.

En la actualidad existe un interés considerable en encontrar alternativas que ayuden a frenar la tendencia creciente de las enfermedades transmitidas por alimentos. Sin embargo, un problema real que la industria alimentaria ha enfrentado, es el hecho de la formación de biopelículas por algunos microorganismos, lo cual los vuelve más resistentes a los métodos convencionales de control. Durante el procesamiento de alimentos, las bacterias son removidas, destruidas o controladas, usando diferentes tratamientos entre los que se encuentran:

- a) Hipoclorito de sodio. Se ha utilizado para controlar la diseminación de patógenos y prevenir la acumulación de microorganismo sobre las superficies de trabajo y equipo, (Keener *et al.*, 2004). Concentraciones de 0.1 mg/ml con

calentamiento a 65°C por 5 min o a 72°C por 1 min son requeridos para inactivar la biopelícula de *Listeria monocytogenes* (Mittelman; 1998). Los niveles más comúnmente usados son de 0.05 a 0.2 mg/ml, sin embargo, el cloro es rápidamente inactivado por material orgánico y puede reaccionar formando compuestos organoclorados carcinogénicos (cloraminas, Komulainen, 2004).

- b) Fosfato trisódico (TSP): posee un efecto antimicrobiano superior comparado con otros fosfatos. Una solución mezclada de TSP tiene un pH de 12 a 13; su alta alcalinidad aparentemente remueve la capa de triglicéridos de la membrana celular provocando que las bacterias drenen su líquido intracelular (Oyarzabal, 2006). El TSP es reconocido como sustancia GRAS (Generally Recognized As Safe) por el US Food and Drug Administration (USA).
- c) Plata iónica. Posee un efecto antimicrobial de amplio espectro. Su efectividad ha sido reportada contra un gran rango de bacterias Gram positivas y negativas, incluyendo *E. coli* y *S. aureus*. Los iones de plata se unen y reaccionan con proteínas y enzimas, provocando un cambio estructural en la membrana y pared celular; culminando con la desintegración celular y muerte bacterial. También se le ha encontrado efectividad contra la biopelícula producida por *P. aeruginosa* a concentraciones de 10 a 100 veces mayor que la concentración de plata necesaria para erradicar las células planctónicas (Bjarnsholt *et al.*, 2007).
- d) Antibióticos. El consenso general sugiere que ciertos antibióticos como las fluoroquinolonas penetran la biopelícula rápidamente mientras que otros antibióticos, como los aminoglicósidos, penetran más lentamente mientras se unen al polímero extracelular como el alginato (Parsek and Fuqua, 2004). Sin embargo, los antibióticos más usados en el tratamiento de infecciones por biopelículas son el ácido fusídico y la rifampicina por ser igualmente efectivos contra células planctónicas y biopelículas (Saginur *et al.*, 2006).
- e) Radiación. La descontaminación de alimentos por radiación ionizante es segura, eficiente, medioambientalmente limpia y es un proceso eficiente en cuanto a

energía. Se puede usar como un proceso de descontaminación de producto terminado sin afectar las cualidades nutricionales, sensoriales y técnicas del producto en cuestión (Farkas; 1998).

La luz UV ha mostrado ser eficaz en la reducción de 5 a 6 log de *E. coli* en sidra de manzana a dosis UV de $\geq 6\ 500\ \mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ (Basaran *et al.*, 2004; Quintero *et al.*, 2004).

La luz pulsada, es un tratamiento que ha emergido en los últimos años como un tratamiento alternativo de inactivación de microorganismos patógenos y esporulados. Su uso está aprobado por la FDA para la descontaminación de alimentos y superficies en contacto con ellos, con la restricción de que las lámparas de destello de Xenón se usen como fuente de luz, con pulsos de duraciones de $< 2\ \text{ms}$ y un tratamiento acumulativo que no exceda los $12\ \text{J}/\text{cm}^2$ (FDA, 1996).

- f) Agentes oxidantes. Soluciones sanitizantes con peróxidos han mostrado ser efectivos para la remoción de biopelículas. Esta reacción es muy rápida (1-2 min) y es relativamente no corrosiva (Deibel, 2000).

El ozono representa una promesa para la desinfección de superficies en contacto con los alimentos. Este es un poderoso agente oxidante, que afecta la membrana lipídica bacterial, los carbohidratos y las proteínas (Mittelman, 1998). El ozono es el sanitizante mas reactivo conocido, tiene un potencial oxidante de $-2.07\ \text{V}$, inactivando rápidamente a los patógenos con baja demanda de ozono en el medio (Khadre *et al.*, 2001). Su uso es permitido en los Estados Unidos (Kim *et al.*, 2003). Su aplicación en forma acuosa sobre lechuga fresca cortada, ha mostrado inactivar de 1.4 a 4.6 log UFC/g de microflora natural (Achen and Yousef, 2001).

El agua ácida electrolizada es generalmente reconocida como segura, y se ha reportado su efectividad en contra de patógenos en productos, siendo

económicamente alternativa para sustituir al agua clorada (Koseki *et al.*, 2003; Sharma and Demirci, 2003).

- g) Otros. El quitosan (poli- β -1,4-glucosamina) es preparado comercialmente por deacetilación alcalina de la quitina obtenida del exoesqueleto de crustáceos marinos. Es un producto no tóxico, biodegradable y de origen renovable. Tiene propiedades antibacteriales y antifúngicas; consecuentemente ha sido estudiado como un potencial agente antimicrobiano natural para alimentos, cosméticos y medicinas. Ha mostrado inhibición del crecimiento de bacterias patógenas entre las que se encuentran *S. entérica* sv. Typhimurium, *S. aureus* y *B. cereus* (Knowles and Roller, 2001).

Recientemente se ha reportado una modalidad capaz de reducir la carga bacterial en productos frescos mediante el uso de bacteriófagos específicos. Los bacteriófagos (fagos) son virus que invaden las células bacteriales causando subsecuentemente su lisis (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Éstos se encuentran de manera ubicua en la naturaleza (Campbell, 2003). Son comensales presentes en varios alimentos (han sido aislados de pollo, salchichas de puerco, carne, agua fresca, pescado salado, leche cruda desnatada, queso, etc.) (Greer, 2005; Kennedy *et al.*, 1984; 1986; Sulakvelidze and Barrow, 2005). Bacteriófagos específicos para *L. monocytogenes* han sido aprobados como “generalmente reconocidos como seguros” específicamente para usarse en embutidos (Anonymous, 2006; 2007).

Dentro de las tecnologías utilizadas para el control o eliminación de contaminación microbiológica de las superficies en industrias de alimentos se encuentra el uso de bacteriocinas (péptidos antimicrobiales producidos por bacterias) y cocultivo con bacterias productoras de bacteriocinas (Foulquie-Moreno *et al.*, 2003; Leriche *et al.*, 1999). Estos péptidos pueden ser activos contra bacterias patógenas, esporuladas y formadoras de biopelículas como *L. monocytogenes*. Nisina, una bacteriocina producida por muchas cepas de *L. lactis*, es la única bacteriocina con aplicación comercial en la industria de alimentos (De Martinis *et al.*, 2001; Leriche *et al.*, 1999).

h) Mezclas de agentes antimicrobianos.

Actualmente las investigaciones se han orientado hacia la búsqueda de compuestos eficaces para inhibir el crecimiento bacteriano así como de remover las biopelículas bacterianas, los cuales tengan la característica de ser de bajo costo (DeQueiroz and Day, 2007).

La combinación de hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno (Ox-B) ha mostrado un efecto sinérgico efectivo para eliminar la biopelícula de *P. aeruginosa* (DeQueiroz and Day, 2007).

Formulaciones hechas en base al efecto sinérgico presentado por la combinación del 5% de peróxido de hidrógeno, 5-15% ácido acético y peracético y 50% de peróxido de hidrógeno con 0.05% de iones de plata han reportado ser efectivas en contra del crecimiento de las bacterias Gram negativas y la formación de biopelícula de *B. subtilis* (Wirtanen *et al.*, 2001).

4.8 Uso de plantas, generalidades.

Se estima que existen aproximadamente 300,000 especies de plantas comestibles; de las cuales, históricamente el ser humano ha comido 2500 con cierta regularidad, pero solamente 150 han entrado al moderno mundo del comercio. Tempranamente, el ser humano debió escoger las plantas que les pareciera más atractivas en color, olor o sabor. Los seres humanos han sido capaces de establecer nuevos usos para muchos productos de las plantas (Simpson and Ogorzaly, 2001).

México tiene una extensa variedad de plantas, es el 4º país más rico del mundo en este aspecto. Algunas 25,000 especies han sido registradas, y se cree que alrededor de unas 30,000 no han sido descritas (Adame and Adame, 2000).

Los productos naturales no tóxicos, compatibles con los alimentos, son una fuente potencial de antimicrobianos útiles para reducir o eliminar microorganismos patógenos en las superficies de frutas y vegetales, carne roja y carne de aves,

utilizadas para minimizar la contaminación de estos alimentos durante su almacenamiento comercial y en el hogar (Friedman *et al.*, 2003).

Plantas, hierbas, y especies, así como sus aceites esenciales derivados y compuestos aislados, contienen un gran número de sustancias que retardan o inhiben el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos. (Alzamora *et al.*, 2003; Davidson, 2001; Davidson and Naidu, 2000; Kong *et al.*, 2007; López-Malo *et al.*, 2000, 2005; Naidu, 2000; Nevas *et al.*, 2004; Nychas *et al.*, 2003; Raybaudi *et al.*, 2006; Santiesteban-López *et al.*, 2007; Sofos *et al.*, 1998).

La actividad biológica de los aceites esenciales depende de su composición química, la cual es determinada por el genotipo de la planta, y es muy influenciada por ciertos factores como el origen geográfico, medio ambiente, y de las condiciones agronómicas (Jordán *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 1999; Sotomayor *et al.*, 2004).

Los aceites volátiles de las plantas son mezclas variables de ciertos componentes, principalmente terpenoides, específicamente monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), y algunos diterpenos (C20). Una variedad de hidrocarburos alifáticos de bajo peso molecular, ácidos, alcoholes, compuestos fenólicos, ésteres acíclicos, o lactonas pueden ser encontradas. Los aceites esenciales con componentes fenólicos, como el carvacrol y timol, han sido reconocidos como altamente activos contra varios microorganismos (Davidson and Naidu, 2000; Falcone *et al.*, 2007; Juneja and Friedman, 2007).

Miembros de esta clase de compuestos son bactericidas o bacteriostáticos, dependiendo de la concentración, y son fuertemente activos dependiendo de su relativa baja capacidad de disolverse en agua. Estos compuestos atacan la membrana citoplásmica, destruyendo su permeabilidad lo que ocasiona la liberación de los constituyentes intracelulares, y causando una disfunción de la membrana con su respectivo transporte de electrones, toma de nutrientes, síntesis de ácidos nucleicos y actividad de la ATPasa (Davidson 2001; Gill and Holley, 2006; López-Malo *et al.*, 2000, 2005; Sofos *et al.*, 1998).

1. Extractos de plantas con actividad antimicrobiana.

Se han analizado metabolitos secundarios de numerosas plantas de los cuales se han encontrado compuestos con gran actividad antimicrobiana, de los cuales *Chondria oppositoclada* significativamente inhibe a bacterias Gram negativas; y *Laurencia pacifica* mostró actividad contra bacterias Gram positivas (James *et al.*, 1975).

El ajo (*Allium sativum L.*) también se ha descrito que posee actividad antimicrobiana. Esta propiedad ha sido atribuida a la presencia del ácido 2-propenesulfónico, que produce la allicina (Persson *et al.*, 2005).

El nopal (*Opuntia ficus*) mostró tener actividad inhibidora del crecimiento de *C. jejuni* y *C. coli* a una concentración de 0.3-0.4 mg/ml (Castillo, 2008).

El jugo de limón (*Citrus limon* Burm. F. y *Citrus aurantifolia* Swingle) posee actividad antibacterial contra algunas especies del genero *Vibrio*, incluyendo *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* (Tomotake *et al.*, 2005), *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* (Enache and Chen, 2007; Nogueira *et al.*, 2003), *C. coli* y *C. jejuni* (Valtierra, 2008).

La ciruela posee actividad antimicrobiana sobre *S. typhi*, *S. typhimurium*, *C. coli* y *C. jejuni* a concentraciones de entre 2 y 36 mg/ml (Valtierra, 2008).

El té verde (*Camellia sinensis L.*) es un brebaje popular y ha sido reportado su efecto benéfico como quimiopreventivo, antioxidante y antimicrobial (Cooper *et al.*, 2005; McKay and Blumberg, 2002; Rietveld and Wiseman, 2003; Tsai *et al.*, 2008). Su extracto ha mostrado tener actividad bactericida contra *E. coli* (Friedman, 2007), siendo también activo contra una variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Lee *et al.*, 2009).

La cascara de naranja agria mostró tener actividad bactericida sobre *S. typhi*, *S. typhimurium* a concentraciones de 34 mg/ml y sobre *C. jejuni* y *C. coli* a concentraciones de 2 mg/ml (Valtierra, 2008).

El albácar (*Ocimum basilicum*) presenta actividad antimicrobiana sobre *C. coli* y *C. jejuni* a una concentración de 4-5 mg/ml (Castillo, 2008).

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.), pertenece a la familia *Lamiaceae*, se utiliza en la industria de los alimentos como agente saborizante. Esta planta posee actividad antioxidante, antibacterial, antimutagénico; además de tener propiedades quimiopreventivas (Rietveld and Wiseman, 2003). El extracto de romero al 1% ha mostrado ser efectivo para inhibir el crecimiento de *B. cereus* y *S. aureus* (Lee *et al.*, 2009)

2. Extractos de plantas con actividad antibiopelícula e inhibidora del QS.

Algunas plantas marinas han sido estudiadas con el objetivo de observar su capacidad para inhibir biopelículas producidas por ciertas bacterias. Un ejemplo de esto son los compuestos halogenados de furanona, encontrados en el alga roja *Delisea pulchra*, los cuales tienen propiedades antimicrobianas y anti-biopelículas. Esta alga, originalmente atrajo la atención de los biólogos marinos, porque disminuía la colonización de microorganismos y biopelículas en otras plantas del mismo ambiente (Hentzer and Givskow, 2003).

Laminaria digitata, es un alga que ha mostrado cierta estrategia de inactivación de señales del quórum sensing involucrado en la formación de biopelícula bacterial. Este proceso consiste en secretar compuestos halogenados oxidados como el ácido hipocloroso e hipobromoso. Estos compuestos han sido usados extensamente para erradicar bacterias en sistemas industriales, ya que su forma de acción radica en la oxidación de las moléculas señales de AHL (Homoserin lactonas) y bloqueando el quórum sensing (Rasmussen and Givskov, 2006).

El ajo (*Allium sativum* L.) contiene tres diferentes compuestos inhibidores del quorum sensing, uno de los cuales contiene un heterociclo de cuatro carbonos y dos átomos de sulfuro. Estos compuestos son fuertemente inhibidores del quorum sensing de *P. aeruginosa* (Rasmussen and Givskov, 2006).

Diospyros dendo también ha sido probada como agente antimicrobiano. Esta especie se conoce que produce triterpenos, de los cuales, cuatro de ellos inhiben la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1 (Hu *et al.*, 2004). Entre estos triterpenos se encuentra el ácido ursólico, el cual es un agente con actividad relativamente no tóxica presente en muchas plantas. Tiene un rango de efectos farmacológicos entre los que destacan la inhibición de mutagénesis en bacterias, actividad antiúlceras, antiinflamatorias, entre otros. Este compuesto ha mostrado inhibición de la biopelícula de *E. coli* aunque no afecta su grado de crecimiento (Ren *et al.*, 2005).

La planta del chícharo (*Pisum sativum*) es hábil para inhibir la producción de pigmentos, actividad de proteasas extracelulares y la actividad exoquitinasa en *C. violaceum*; además se ha reportado que es capaz de interferir con el quórum sensing (Rasmussen and Givskov, 2006).

3. Compuestos naturales aislados.

Se han realizado estudios para medir la actividad inhibitoria de biopelículas de los compuestos naturales contra patógenos presentes en los alimentos. Por ejemplo, se ha encontrado que el carvacrol (C₁₀H₁₄O) es el mayor componente presente en el aceite esencial de orégano. Este compuesto está reconocido como seguro, y es usado como agente saborizante en productos como dulces y bebidas, entre otros. Su actividad antimicrobial está documentada contra hongos y bacterias, entre los cuales se encuentran *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. entérica* sv. Typhimurium, *S. aureus* y *B. cereus*. Por ejemplo tratamientos con carvacrol 2 mM reducen el conteo de células viables en biopelículas de *Listeria* y *Salmonella* (Knowles and Roller, 2001).

Las furanonas pueden inhibir ciertas actividades de bacterias Gram negativas sin afectar su grado de crecimiento. Entre estas actividades se incluye el swarming de *Proteus mirabilis* (Gram *et al.*, 1996), la formación de biopelícula de *E. coli* (Ren *et al.*, 2001), y la bioluminiscencia (Defoirdt *et al.*, 2006)

4. Mezclas de plantas.

Aunque la gran mayoría de los estudios realizados sobre validación científica del uso de las plantas se ha realizado analizando a las plantas en forma individual, existe

una tendencia actual de analizar la capacidad antimicrobiana de los extractos cuando se encuentran en mezclas. En relación con esto, se ha reportado la existencia de sinergismo entre la vainillina y el sorbato de potasio, y una actividad aditiva entre carvacrol y timol (López-Malo, *et al.*, 2006).

Existen otros reportes sobre la existencia de efectos sinérgicos entre plantas como el reportado por Venegas (2007), en donde utilizó al extracto de palo de Brasil como base debido a su mayor potencial antimicrobiano y lo combinó con huizache, mezquite y ébano.

Valtierra (2008) reportó la indiferencia existente entre los extractos de limón, ciruela y naranja agria.

La mezcla de *Scutellaria*, campanita china (*Forsythia*), canela (*Cinnamomum verum*) y madre selva (*Lonicera caprifolium*), a una concentración de 0.5 mg/ml mostró un efecto sinérgico bactericida contra *E. coli* (Kong *et al.*, 2007).

Mau y cols. (2001) reportaron la acción sinérgica de los extractos de cebollín chino (*Allium tuberosum*) y canela (*Cinnamomum verum*), contra el crecimiento de *E. coli*. También encontraron que el efecto de esta mezcla se mantenía frente a condiciones externas de calor, pH extremo y almacenaje prolongado.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, 43894 y 43895, proporcionadas por la Dra. Lynne A. McLandsborough del Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Massachusets, Amherst, MA, E. U. La cepa ATCC 43890 GFP (utilizadas únicamente para el ensayo de CMB en un coctel bacteriano) fue proporcionada por el Dr. Peter Feng de la División de Microbiología del Departamento de Fármacos y Alimentos de E.U. Éstas se mantuvieron a 4°C en Agar Infusión Cerebro Corazón (ICC, Difco) con siembras periódicas cada tres meses.

Para la activación de las cepas se tomó una alícuota del cultivo de reserva y se inoculó en 5 ml de caldo ICC. Los tubos se incubaron a 37° C durante 24 hr. El inóculo se ajustó al 0.5 del Nefelómetro de McFarland (1×10^8 UFC/ml) (Luciano *et al.*, 2008).

Para la obtención de un coctel bacteriano, compuesto de cuatro cepas, se procedió a partir de las cepas activadas. Posteriormente se realizó un subcultivo inoculando 50 µl en 5 ml de caldo Mueller Hinton (Difco). Los tubos se incubaron a 37°C hasta la mitad de la fase logarítmica ($DO_{610nm} = 0.5$), aproximadamente a 10^8 UFC/ml. Volúmenes iguales de cada una (5 ml) fueron combinadas en un matraz estéril (Vijay and Friedman, 2008).

5.2 Plantas utilizadas

El material vegetal en este estudio fue colectado en centros comerciales del área metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León y se describen en la tabla Tabla 2.

Tabla 2.

Nombre común y científico así como partes de las plantas utilizadas.

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada
Anacua	<i>Ehretia anacua</i>	Hojas
Betabel	<i>Beta vulgaris</i> var. Conditiva	Cáscara y pulpa
Brócoli	<i>Brassica oleracea</i> itálica	Tallo y hoja
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Bulbo
Cebolla cambray	<i>Allium schoenoprasum</i>	Hoja y bulbo
Chile poblano	<i>Capsicum sp</i>	Fruto
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Tallo y hoja
Ciruella pasa	<i>Prunus domestica</i>	Fruto
Comino	<i>Cuminum cyminum</i>	Semilla (fruto)
Guayaba	<i>Psidium spp.</i>	Cáscara y fruto
Jamaica	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Flor

Tabla 2 (Continuación).

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada
Jícama	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Cáscara y fruto
Limón	<i>Citrus limón</i>	Cáscara, pulpa y jugo
Mango	<i>Magnifera sp</i>	Cáscara y fruto
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	Tallo y hoja
Melón chino	<i>Cucumis melo</i>	Cáscara y fruto
Mezquite	<i>Prosopis spp</i>	Hojas
Mora	<i>Morus</i>	Fruto
Mostaza	<i>Brassica juncea</i>	Semilla
Naranja valencia	<i>Citrus sinensis</i>	Cáscara y fruto
Nopal	<i>Opuntia ficus</i>	Tallo
Orégano	<i>Lippia graveolens</i>	Tallo y hoja
Papaya	<i>Corica papaya</i>	Cáscara y fruto
Pimienta gorda	<i>Piper nigrum</i>	Fruto
Pimiento rojo	<i>Capsicum annum</i>	Fruto
Piña	<i>Anana comosus</i>	Cáscara y fruto
Rábano	<i>Raphanus sativus var. sativus</i>	Fruto
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Hojas
Sandia	<i>Cutrullus lanatus</i>	Cáscara y fruto
Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i>	Cáscara y fruto
Té negro	<i>Camellia sinensis</i>	Hojas
Té verde	<i>Camellia sinensis</i>	Hojas
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Hojas
Uva pasa	<i>Vittis sp.</i>	Fruto
Zacate de limón	<i>Cymbopogun citratus</i>	Hoja

5.3 Obtención de los extractos.

Se colocaron 20 g de material vegetal seco en un vaso de licuadora a la que se agregaron 100 ml del solvente (etanol al 96% y metanol) y se trituró durante 2 min. Los extractos obtenidos fueron macerados durante 48 h a temperatura ambiente (Cho *et al.*, 2008). Posteriormente, se filtró utilizando papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se colocó en platos de vidrios y el solvente se evaporó a temperatura ambiente. Una vez seco, el extracto se resuspendió en los solventes probados (agua, etanol al 96% y metanol). El extracto se colocó en viales estériles de color ámbar, y se mantuvo a 4° C hasta su uso, durante un máximo de 6 meses.

5.4 Determinación del peso seco.

Para determinar la concentración de los extractos obtenidos, se tomó 1 ml de cada extracto y se colocó en un tubo de ensayo previamente tarado, estos se colocaron en una estufa a 50°C hasta obtener un peso constante. La diferencia de peso del tubo antes y después de colocar el extracto correspondió a la concentración del extracto (Alarcón, 2000).

5.5 Ensayo preliminar de susceptibilidad antimicrobiana.

Se utilizó el método de difusión en pozo en agar (García *et al.*, 2005). Por lo que se sembró por extensión con un asa de Driglalsky 100 µl de las cepas activadas en placas de agar Mueller Hinton.

Posteriormente, se realizaron pozos en el agar, utilizando un tubo Durham invertido (5 mm de diámetro) en los cuales se agregaron 100 µl de los extractos

probados; como blanco se adicionó a uno de los pozos etanol al 96%. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h en condiciones de aerobiosis.

El efecto del extracto se observó mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo.

5.6 Determinación de concentración mínima bactericida (CMB).

La determinación de la CMB se realizó a aquellos extractos que presentaron el mayor halo de inhibición. La determinación de la CMB se llevó a cabo por el método de microdilución (PROY-NOM-059-PESC-2004), el cual está basada en los estándares establecidos por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards); sin embargo, se realizaron ciertas modificaciones. Se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pozos estériles (Buck y Kelly, 1982). Los pozos fueron llenados con 150 µl de caldo Mueller Hinton. Posteriormente se agregaron los extractos en diferentes concentraciones, tal como lo muestra la Tabla 3 (Luber *et al*, 2002).

Tabla 3.

Uso de microplacas. Contenido de los pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	-	>	→	→	→	→	→	→	→	→	<
B	+	-	>	→	→	→	→	→	→	→	→	<
C	+	-	>	→	→	→	→	→	→	→	→	<
D	+	-	>	→	→	→	→	→	→	→	→	<
E	+	-	>	→	→	→	→	→	→	→	→	<
F	+	-	>	→	→	→	→	→	→	→	→	<
G	+	-	>	→	→	→	→	→	→	→	→	<
H	+	-	>	→	→	→	→	→	→	→	→	<

+ : Control positivo. 150 µl de medio de cultivo.

- : Control negativo. 150 µl de medio de cultivo + 1.5 µl de solución salina.

> : Concentración máxima. 150 µl de medio de cultivo + 150 µl del extracto concentrado.

→ : Concentraciones intermedias. 150 µl de medio de cultivo + 150 µl del pozo anterior.

< : Concentración mínima. 150 µl de medio de cultivo + 150 µl del pozo anterior y se descartan 150 µl.

Las placas se inocularon con 1 % v/v de las cepas ATCC 43894 y 43895 activadas (Olasupo *et al*, 2003) y ajustadas a una concentración de 10^8 células/ml, con excepción del pozo de control negativo, al cual se le agregó agua estéril. Se incubaron las placas a 37° C por 24 h. Después de la incubación, se tomaron 100 µl de cada pozo y se sembraron en agar Mueller Hinton por difusión. Una vez ubicado el rango de concentraciones entre las que se produjo inhibición, concentraciones puntuales fueron colocadas en una microplaca de poliestireno de 96 pozos, y se

prosiguió a la inoculación, incubación y siembra como se mencionó anteriormente; estableciéndose así la Concentración Mínima Bactericida (CMB), la cual se definió como la concentración mínima de extracto que inhibió completamente el crecimiento microbiano.

5.7 Determinación de la concentración mínima bactericida de un coctel bacteriano.

La determinación de la concentración mínima bactericida de un coctel bacteriano se realizó igual que en el punto anterior, solamente que en este caso, se preparó previamente el coctel de cepas, como está especificado en la sección anterior. Después de la incubación, se tomaron 20 μ l de cada pozo y se sembraron por el método de Miles y Mishra (Miles and Mishra, 1932) en agar Mueller Hinton.

5.8 Determinación de la concentración mínima bactericida de un antimicrobiano natural comercial (Citrol K-Ultra).

Se realizó como en los puntos anteriores, solamente que en este caso, en vez de colocar el extracto de planta se agregó Citrol K-Ultra a concentraciones de 400, 200 y 100 mg/l. El resto del procedimiento se realizó como en el punto anterior.

5.9 Determinación del efecto de las concentraciones subletales de los extractos activos sobre el crecimiento microbiano.

Determinamos si concentraciones inferiores de la CMB (25, 50 y 75%) de los extractos que resultaron más activos tenían un efecto sobre la viabilidad de las cepas de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 y 43895. Para esto, se añadieron 12, 9, 6 y 3 μ l de *Citrus limon* y 11, 8, 5 y 2 μ l de *Lippia graveolens* los cuales correspondían a las concentraciones mencionadas a pozos de una microplaca estéril de poliestireno que contenían previamente 300 μ l de caldo Mueller Hinton y la cepa previamente

ajustada (1×10^8 UFC/ml). El sistema fue incubado por 24 h a 37°C. Se realizó un recuento de las células viables tomando alícuotas de 200µl, realizando diluciones decimales y sembrando 25µl por el método de Miles y Mishra en placas con agar Mueller Hinton. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación se determinó el número de células obtenidas. Como controles se utilizaron las cepas que no tuvieron contacto con el extracto (control de crecimiento) y las cepas incubadas con el solvente utilizado para los extractos (control con solvente).

5.10 Determinación de combinaciones efectivas de los extractos activos (*Citrus limon* y *Lippia graveolens*).

Se analizaron combinaciones de los extractos que presentaron mejor actividad, a fin de establecer un posible efecto sinérgico de inhibición de crecimiento contra las cepas de *E. coli* analizadas. La determinación se realizó mediante el método de tablero descrito por Orhan y colaboradores (2005); con ciertas modificaciones. Se colocaron 50 µl de caldo Mueller Hinton en los pozos de las siete filas centrales de una microplaca estéril de 96 pozos. En la fila A de la microplaca se añadió la CMB del extracto de *Citrus limon* y en la columna 8 la CMB del extracto de *Lippia graveolens*. Posteriormente se realizaron diluciones dobles seriadas del extracto de *C. limon* de arriba hacia abajo y del extracto de *L. graveolens* de derecha a izquierda. Posteriormente se inocularon los pozos con el 1% v/v de la cepa ajustada a 1×10^8 UFC/ml de las cepas individuales (Tabla 4). Los sistemas se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente se realizó el plaqueo de cada uno de los pozos por el método de Miles y Mishra en placas con agar Mueller Hinton.

Tabla 4.

Ensayo de mezclas de extractos de plantas. El esquema corresponde a la manera en la que se realizaron las combinaciones entre los extractos de *Citrus limon* y *Lippia graveolens*.

	A ↓	A ↓	A ↓	A ↓	A ↓	A ↓	A ↓	A B
A	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	B ←
B	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	B ←
C	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	B ←
D	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	B ←
E	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	B ←
F	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	B ←
G	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	B ←
H	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	↓ ←	B ←

A: CMB del extracto de *Citrus limon*.

B: CMB del extracto de *Lippia graveolens*.

AB: Combinación de las CMBs de los extractos *Citrus limon* y *Lippia graveolens*.

↓: Dilución del extracto A hacia abajo.

←: Dilución del Extracto B hacia la izquierda.

El efecto de las combinaciones se evaluó por el índice de concentración fraccionaria bactericida (FBC). Los FBCs fueron calculados como la CMB de los extractos combinados divididos entre la CMB de los extractos individuales; el índice ΣFBC se obtuvo sumando las FBCs de los dos extractos.

FBC A= CMB A en combinación / CMB A solo

FBC B= CMB B en combinación / CMB B solo

$$\Sigma\text{FBC} = \text{FBC A} + \text{FBC B}$$

Los índices FBC se interpretaron de la siguiente forma: cuando la ΣFBC fue cercana a 1 significaba existencia de un efecto aditivo; $\Sigma\text{FBC} < 1$ significó sinergismo y $\Sigma\text{FBC} > 1$ significó existencia de antagonismo entre los extractos probados (López-Malo *et al.*, 2005).

5.11 Efecto de los extractos de *C. limon* y *L. graveolens* sobre la formación de biopelícula de *E. coli* O157:H7.

Para evaluar el efecto de los extractos de plantas sobre la formación de biopelículas en las cepas de *E. coli* O157:H7 analizadas se utilizó el método de tinción con safranina y medición de Densidad Óptica, reportados por Moretro y col. (2008). Las cepas de *E. coli* individuales (43894 y 43895) previamente activadas (1×10^8 UFC/ml) se inocularon (1% v/v) en pozos de una microplaca conteniendo 300 μl de caldo Soya Trypticasa (TSB, DIFCO) suplementado con 0.1% de sacarosa (FERMONT), y los extractos de plantas en las concentraciones establecidas (25, 50 y 75 % de la CMB). Se incubaron por 48 h a 37°C. Para cuantificar la masa de la biopelícula se eliminó el medio con la bacteria (succión con micropipeta en condiciones de esterilidad), y posteriormente se lavó tres veces con 200 μl de agua destilada (mediante succión por micropipeta) con el fin de eliminar todas las células que no formaban parte de la biopelícula. La microplaca fue secada durante 24 h a 37°C (en incubadora). Posteriormente se adicionó safranina acuosa al 1% (p/v, Analytyka) para teñir la masa adherida. Después de 20 min se eliminó el colorante (mediante una micropipeta) y se lavaron tres veces los pozos con agua destilada. A este punto, la biopelícula fue visible como un anillo rojo en el fondo del pozo. El colorante se solubilizó con 200 μl de etanol al 96%. Por último se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de ELISA (modelo 550 Bio-Rad Laboratories, T. Moretro *et al.*, 2008; Djordjevic *et al.*, 2002).

La biopelícula se definió como el porcentaje de formación en base a las lecturas de absorbancia de los tratamientos con sus controles.

5.12 Determinación de swarming de *E. coli* O157:H7 en presencia de *Citrus limon* y *Lippia graveolens*.

Para el ensayo de swarm se siguieron los protocolos descritos por Vattem y col. (2007) y Li y col. (1993), con algunas modificaciones. Con el fin de determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) del swarming en presencia del extracto, se prepararon placas de poliestireno de 6 pozos (4 cm de diámetro) con caldo Mueller Hinton conteniendo 0.3% (p/v) de agar bacteriológico; a cada pozo se le añadió el extracto seleccionado a la concentración deseada (100, 75, 50 y 25% de la CMB; y mezclas de *Citrus limon* - *Lippia graveolens* a concentraciones de 0.023-0.375, 0.046-0.375 y 0.023-0.1875 mg/ml). El volumen final del medio y extractos fue de 5ml (Vattem *et al.*, 2007). En el centro de las placas se inoculó 2µl de la cepa activada (crecidas toda la noche en caldo Mueller Hinton y ajustada a una concentración de 10^8 UFC/ml o 0.5 D_{610nm}) y posteriormente incubadas por 48 h a 37°C (Vattem *et al.*, 2007). La CMI se definió como la concentración más baja que inhibió completamente el swarming después de la incubación (Li *et al.*, 1993).

5.13 Determinación colorimétrica de grupos químicos.

A los extractos de *C. limon* y *L. graveolens* que mostraron tener actividad biológica, se les realizaron ensayos químicos con las metodologías reportadas (Domínguez, 1988), para determinar en forma general los grupos químicos que poseen.

5.13.1 Hidrocarburos insaturados.

Para determinar insaturaciones se utilizó la prueba de Bayer en donde se colocaron 2 gotas del extracto en una placa de porcelana y se agregaron 1-2ml de acetona (CTR SCIENTIFIC), posteriormente se le agregó gota a gota una solución

acuosa de permanganato de potasio (FERMONT) al 1%. La aparición de un precipitado café indicó la presencia de hidrocarburos insaturados (Dominguez, 1988).

5.13.2 Saponinas.

Para determinar saponinas, se colocó un mililitro del extracto concentrado en una placa de porcelana, posteriormente se agitó vigorosamente con un vortex. La aparición de abundante espuma indicó la presencia de saponinas (Dominguez, 1988).

5.13.3 Flavonoides.

Para determinar flavonoides se utilizó la Prueba de Shinoda donde el extracto fue mezclado en un fragmento de limadura de magnesio (CTR SCIENTIFIC) y cuatro gotas de ácido clorhídrico concentrado (CTR SCIENTIFIC). La prueba fue positiva cuando se presentaron coloraciones: naranja (flavonas), roja (flavonas), roja azulosa (flavonoles) ó violeta (xantanas o flavonoles) (Dominguez, 1988).

5.13.4 Sesquiterpenlactonas.

Para determinar los grupos de sesquiterpenlactonas se utilizó la prueba de Legal. En este caso, se depositaron 2 gotas del extracto en una placa de porcelana, se agregaron 3 gotas de piridina (BAKER) y una gota de nitroprusiato de sodio (CTR SCIENTIFIC) al 0.5% y después se añadieron gota a gota, 4 gotas de hidróxido de potasio 2N. Una coloración rosa fue indicio de lactonas α y β insaturadas (Dominguez, 1988)

5.13.5 Carbohidratos.

Se determinaron carbohidratos mediante la prueba de la Antrona. Se colocó una gota de la muestra disuelta en agua con 1 gota de antrona (FERMONT) al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado (EM SCIENCE) sobre una placa de porcelana. La prueba se consideró positiva al formarse un anillo-verdoso en la interfase (Dominguez, 1988).

5.13.6 p-benzoquinonas.

Para determinar p-benzoquinonas se mezcló una gota de la muestra sobre una placa de porcelana, con una gota de solución etanólica al 0.2% de p-nitrofenilacetoniitrilo (ALFA AESAR) y 1 gota de hidróxido de sodio (CTR SCIENTIFIC). La prueba fue positiva al observarse una coloración azul o violeta (Dominguez, 1988).

5.13.7 Alcaloides.

Se utilizó la prueba de Dragendorff para determinar alcaloides. Para esto se realizaron dos soluciones. La solución A se preparó mezclando 8 g de nitrato de bismuto (FERMONT) con 20 ml de ácido nítrico (CTR SCIENTIFIC) al 30%, y la solución B mezclando 27.2g de yoduro de potasio (TECNICA QUIMICA) en 50ml de agua. Se mezclaron las soluciones A y B y se dejaron reposar 24 h. Esta mezcla se filtró y se aforó a 100 ml con agua bidestilada. Se agregaron unas cuantas gotas de este reactivo a la muestra que se había colocado en una placa de porcelana. La prueba fue positiva cuando se presentó un precipitado de color naranja-marrón (Dominguez, 1988).

5.13.8 Cumarinas.

Se determinaron cumarinas con la prueba de Emerson. Se mezclaron 0.5% de carbonato de calcio (MERCK), 0.9% de 4-aminoantipirina (SPECTRUM), 5.4% de ferrocianuro de potasio (CTR SCIENTIFIC) en agua, una gota de esta mezcla se agregó a una gota de la muestra sobre una placa de porcelana. La prueba fue positiva al observarse una coloración amarilla. Por otro lado también se mezcló la muestra con una gota de hidróxido de sodio (CTR SCIENTIFIC) al 10%; una coloración amarilla indicó la presencia de cumarinas (Dominguez, 1988).

5.13.9 Aldehídos y cetonas.

Para la determinación de aldehídos y cetonas, sobre una placa de porcelana, a una gota del extracto se le agregaron 2 gotas de etanol (DEQ) y 1 gota de 2,4-dinitrofenilhidracina (SPECTRUM), para lo cual se disolvió en caliente 5 g de 2,4-dinitrofenilhidracina en 60 ml de ácido fosfórico (CTR SCIENTIFIC) al 85%, se diluyeron con 39.5 ml de etanol y después se filtró. La presencia de un precipitado

rojo indicó positivo para carbonilos aromáticos, un precipitado anaranjado indicó carbonilos α y β insaturados y/o un precipitado amarillo fue positivo para carbonilos saturados (Dominguez, 1988).

5.13.10 Cloruros.

Para detectar cloruros, en una placa de porcelana se colocó una gota de extracto y se disolvió en agua bi-destilada (3 ml) y se le añadieron 2 o 3 gotas de una solución de nitrato de plata, la cual se preparó disolviendo 10 mg de nitrato de plata (CTR SCIENTIFIC) con 20 ml de agua bi-destilada. Para la presencia de cloruros se presentó un precipitado blanco (Dominguez, 1988).

5.13.11 Taninos.

En la determinación de taninos, se disolvió 1 ml de la muestra en 1 ml de agua y 1 ml de etanol (DEQ), se añadieron unas gotas de cloruro férrico (CTR SCIENTIFIC) al 5% etanol (p/v); una coloración verde oscuro o negra fue indicativo de hidroxilos fenólicos (Dominguez, 1988).

5.14 Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 17.0 y SigmaPlot versión 11.0. Se utilizó estadística descriptiva: media, desviación estándar y ANOVA. Se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey para evaluar las diferencias entre los valores promedio obtenidos del porcentaje de formación de biopelícula (basado en las lecturas de absorbancia del ensayo de formación de biopelícula con safranina) y la formación de swarming.

6. RESULTADOS

6.1 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

Se estudiaron en total 36 plantas, las cuales se dividieron de acuerdo a su forma de extracción (etanólica, metanólica y/o acuosa), obteniéndose un total de 50 extractos; los cuales fueron probados con las cepas ATCC 43894 y ATCC 43895. De estos extractos sólo 10 presentaron actividad inhibitoria del crecimiento de *E. coli* O157:H7 (Tabla 6).

Los halos de inhibición de los extractos con actividad fueron de entre 0.2 a 1.2 cm de diámetro, y correspondieron a extractos etanólicos y metanólicos, siendo los etanólicos los de mayor actividad y los acuosos los que no presentaron actividad (Tabla 5).

Las plantas seleccionadas para estudios posteriores fueron las que presentaron un halo mayor a 1.0 cm de diámetro cuya extracción fue a base de etanol; esto con el fin de obtener una cantidad significativa de compuestos activos en un solvente y que no fuera tóxico para el consumo humano.

Tabla 5.

Efecto sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 por extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de diferentes plantas (Resultados en cm de diámetro de inhibición)

Planta	Cepas utilizadas					
	ATCC 43894			ATCC 43895		
	Ac	EtOH	MetOH	Ac	EtOH	MetOH
Anacua	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Betabel	NI	NP	NP	NI	NP	NP
Brócoli	NP	0.4±0.2	NP	NP	0.4±0	NP
Cebolla	NI	NI	NP	NI	NI	NP
Cebolla morada	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Cebolla cambray	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Chile poblano	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Cilantro	NP	0.2±0	NP	NP	0.2±0.05	NP
Ciruella pasa	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Comino	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Guayaba	NP	NP	NI	NP	NP	NI
Jamaica	NP	1.1±0.1	NP	NP	1.1±0.1	NP
Jícama	NI	NI	NP	NI	NI	NP
Limón C/c	NP	1.10±0.14	NP	NP	1.05±0.07	NP
Mango	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Mejorana	NP	NP	0.9±0.2	NP	NP	0.8±0.2

Ac: Extracción etanólica con resuspensión acuosa

EtOH: Extracción etanólica con resuspensión etanólica

MetOH: Extracción metanólica con resuspensión metanólica

NI: No Inhibición

NP: No probado

C/c: Con cáscara

Resultados ± desviación estándar

Continuación de la Tabla 5.

Planta	Microorganismos y solventes analizados					
	ATCC 43894			ATCC 43895		
	Ac	EtOH	MetOH	Ac	EtOH	MetOH
Melón chino	NI	NI	NP	NI	NI	NP
Mezquite	NP	1.0±0.09	NP	NP	0.93±0.1	NP
Mora	NP	NP	NI	NP	NP	NI
Mostaza	NP	0.3±0.1	NP	NP	0.2 ± 0	NP
Naranja valencia	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Nopal	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Orégano	NP	1.20±0.14	NP	NP	1.07±0.1	NP
Papaya	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Pimienta gorda	NI	NI	NP	NI	NI	NP
Pimiento rojo	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Piña	NI	NI	NP	NI	NI	NP
Rábano	NP	0.2±0	NP	NP	0.2±0.07	NP
Romero	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Sandía	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Tamarindo	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Té negro	NP	NI	NI	NP	NI	NI
Té verde	NP	0.4±0	NI	NP	0.5±0.1	NI
Tomillo	NP	NP	NI	NP	NP	NI
Uva pasa	NP	NI	NP	NP	NI	NP
Zacate de limón	NP	NI	NP	NP	NI	NP

Ac: Extracción etanólica con resuspensión acuosa

EtOH: Extracción etanólica con resuspensión etanólica

MetOH: Extracción metanólica con resuspensión metanólica

NI: No Inhibición

NP: No probado

C/c: Con cáscara

Resultados ± desviación estándar

6.2 Determinación de concentración mínima bactericida (CMB).

Se seleccionaron sólo los extractos de *Citrus limon* (cáscara de limón) y *Lippia graveolens* (orégano); ya que fueron los que presentaron el mayor halo de inhibición y que el solvente no fuera de naturaleza tóxica para el consumo humano.

Se determinó la Concentración Mínima Bactericida del extracto de *C. limon* y *L. graveolens* la cual varió entre 1.5 y 3 mg/ml en ambas cepas. Cuando analizamos la mezcla comercial Citrol-K Ultra el CMB obtenido para ambas cepas fue de 0.1 mg/ml (Tabla 6).

Tabla 6.

Determinación de la concentración mínima bactericida (mg/ml).

Extracto	Nombre Científico	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43894	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895
Cascara de limón	<i>Citrus limon</i>	3 ± 0	3 ± 0
Oregano	<i>Lippia graveolens</i>	1.5 ± 0	1.5 ± 0
Citrol-K Ultra		0.1 ± 0	0.1 ± 0

Resultados ± desviación estándar

6.3 Determinación de concentración mínima bactericida (CMB) de un coctel de cepas de *E. coli* O157:H7.

Se determinó la concentración mínima bactericida del extracto de *C. limon* y de *L. graveolens* en un coctel de cepas (43890, 43890 GFP, 43894 y 43895). La CMB obtenida varió de 1 a 8 mg/ml (Tabla 7). Se observó que las CMBs obtenidas fueron mayores con respecto a las CMBs obtenidas por las cepas individuales, por lo que no se observó un efecto sinérgico de los extractos contra las cepas analizadas.

Tabla 7.

Determinación de la concentración mínima bactericida (mg/ml) de los extractos elegidos sobre un coctel de cepas de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43890, 43890 GFP, 43894 Y 43895)

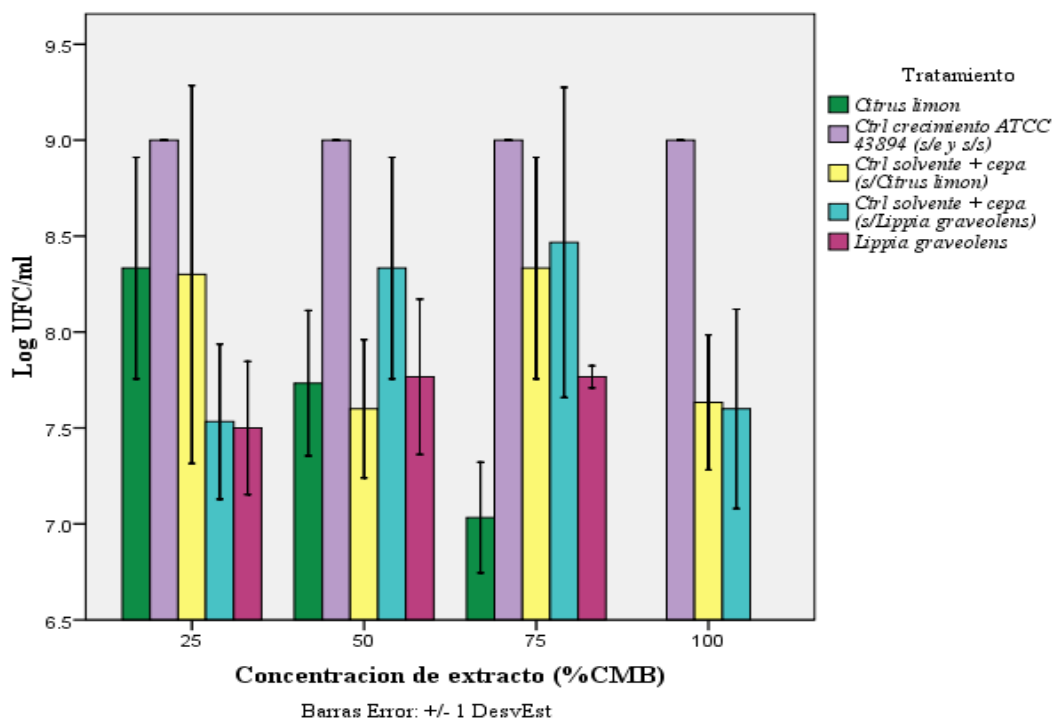
Extracto	Nombre Científico	Mezcla de cepas de <i>E. coli</i>
Cáscara de limón	<i>Citrus limon</i>	8 ± 0
Orégano	<i>Lippia graveolens</i>	1 ± 0

Resultados ± desviación estándar

6.4 Determinación del efecto de concentraciones subletales de los extractos de plantas sobre el crecimiento microbiano.

Cuando analizamos el efecto de concentraciones menores a la CMB de los extractos *C. limon* y *L. graveolens* sobre la viabilidad de dos cepas de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894 y ATCC 43895), encontramos que no se presentó ($p \geq 0.01$) efecto inhibitorio del crecimiento, al analizar concentraciones equivalentes al 25, 50 y 75% de la CMB (Figura 3).

Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Citrus limon* y *Lippia graveolens* sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894



Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Citrus limon* y *Lippia graveolens* sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895

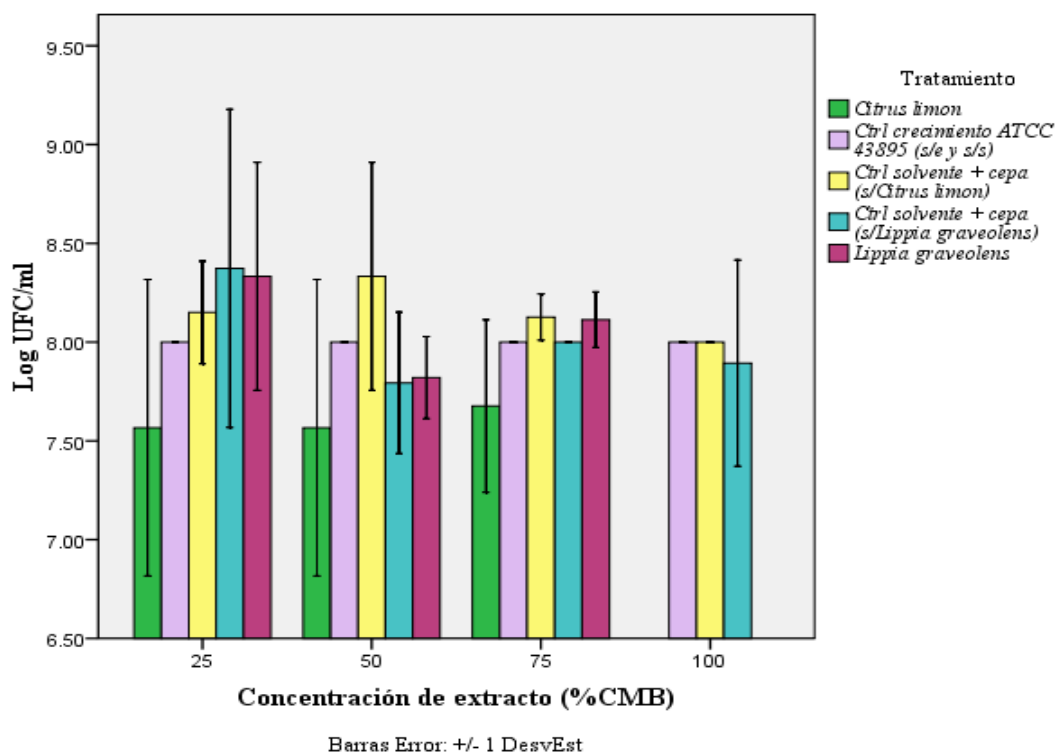


Figura 3. Efecto de concentraciones subletales de *C. limon* y *L. graveolens* sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 (s/: Sin, s/e: Sin extracto y s/s: Sin solvente).

6.5 Determinación de efecto de combinaciones de los extractos de *C. limon* y *L. graveolens* sobre la viabilidad de *E. coli* O157:H7.

La prueba para la determinación de la existencia de un posible efecto sinérgico o antagonístico entre los extractos de *C. limon* – *L. graveolens* indicó la existencia de un efecto sinérgico entre los extractos a las concentraciones de 0.19-0.75, 0.9–0.75 y 0.02–0.75 mg/ml (Fig 4); siendo la combinación más efectiva la correspondiente al 0.02–0.75 mg/ml. Al analizar los FBCs, encontramos que la mezcla correspondiente a la concentración de 1.5–0.75 mg/ml indicó aditividad (Tabla 8).

Tabla 8.

Índice Fraccionario de Concentración Bactericida (FBC_{Índice}) para *E. coli* O157:H7 usando una mezcla de *Citrus limon* y *Lippia graveolens*.

CEPA	<i>Citrus limon</i> (mg/ml)	<i>Lippia graveolens</i> (mg/ml)	FBC _{Índice}
43894	0.02	0.75	0.5 ± 0 (S)
	0.18	0.75	0.6 ± 0 (S)
	0.09	0.75	0.8 ± 0 (S)
43895	0.02	0.75	0.5 ± 0 (S)
	0.18	0.75	0.6 ± 0 (S)
	0.09	0.75	0.8 ± 0 (S)
	1.5	0.75	1 ± 0 (A)

Resultados ± Desviación estándar.

(A): Aditividad

(S): Sinergismo

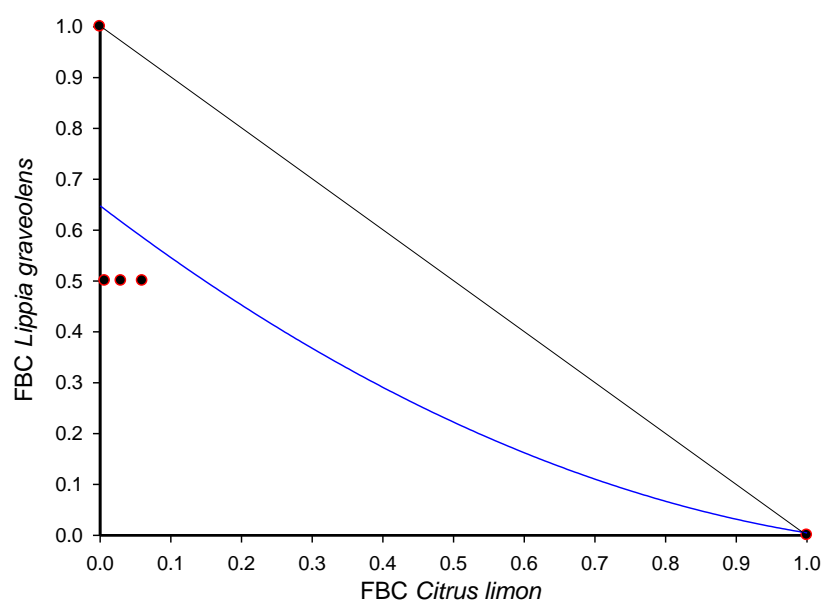
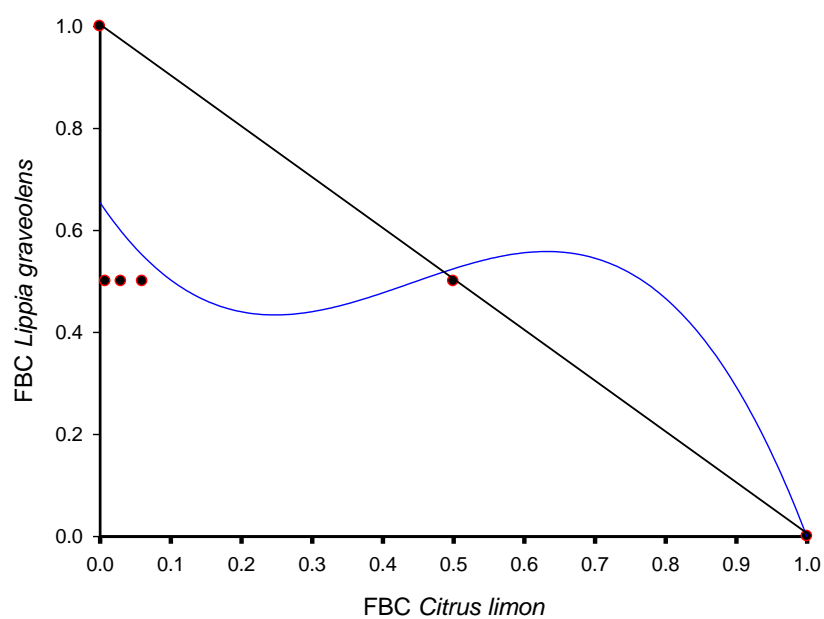
Concentración Fraccionaria Bactericida (FBC) de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894Concentración Fraccionaria Bactericida de *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895

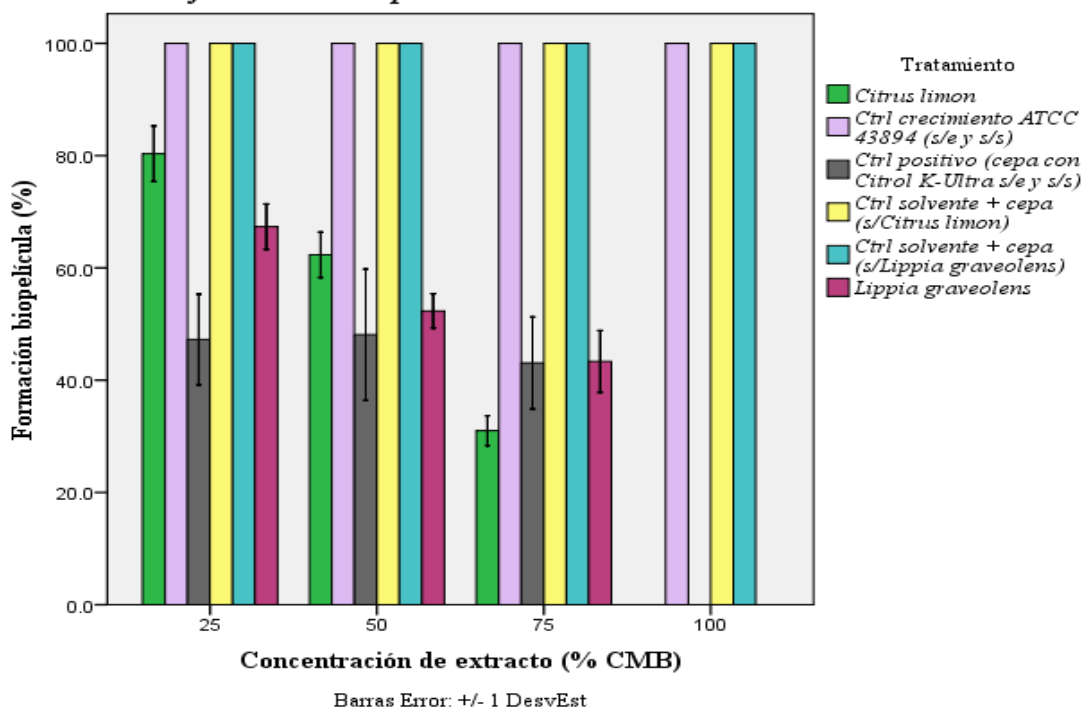
Figura 4. Concentración Fraccionaria Bactericida (FBC) de la combinación de *C. limon* y *L. graveolens* que inhiben a *E. coli* O157:H7 en caldo Mueller Hinton después de 24 h de incubación a 37°C.

6.6 Efecto de los extractos de *C. limon* y *L. graveolens* sobre la formación de biopelícula de *E. coli* O157:H7.

Este ensayo se realizó utilizando los extractos de *C. limon* y *L. graveolens*. Se observó que los extractos probados afectaron de manera similar, inhibiendo significativamente ($p \geq 0.01$) la formación de biopelícula de las cepas analizadas. Se analizaron diferentes concentraciones de los extractos correspondientes al 25, 50 y 75% de la CMB, encontrando un efecto inhibitorio estadísticamente significativo ($p \leq 0.01$) de formación de biopelícula, el cual fue dependiente de la concentración de extracto utilizada. Al utilizar el 100% de la CMB, no hubo formación de biopelícula debido a la ausencia de células viables, mientras que en los controles de solvente (cepa más solvente sin extracto) la formación de biopelícula se mantuvo en el mismo nivel ($p \geq 0.01$) que el control de crecimiento (cepa sin solvente y sin extracto) a 48 h (Figura 5).

Cuando analizamos la mezcla de los extractos encontramos una disminución significativa ($p \leq 0.01$) en la formación de biopelícula en ambas cepas (Figura 6). Además se encontró que esta disminución de formación de biopelícula fue semejante al utilizar diferentes combinaciones de los extractos (0.023-0.19, 0.023-0.38 y 0.4-0.38 mg/ml). El control positivo utilizado (cepa con Citrol K-Ultra, sin extracto y sin solvente) resultó ser significativamente efectivo ($p \leq 0.01$) en ambas cepas para inhibir la formación de biopelícula comparado con los extractos analizados.

Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Citrus limon* y *Lippia graveolens* sobre la formación de biopelícula de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894



Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Citrus limon* y *Lippia graveolens* sobre la formación de biopelícula de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895

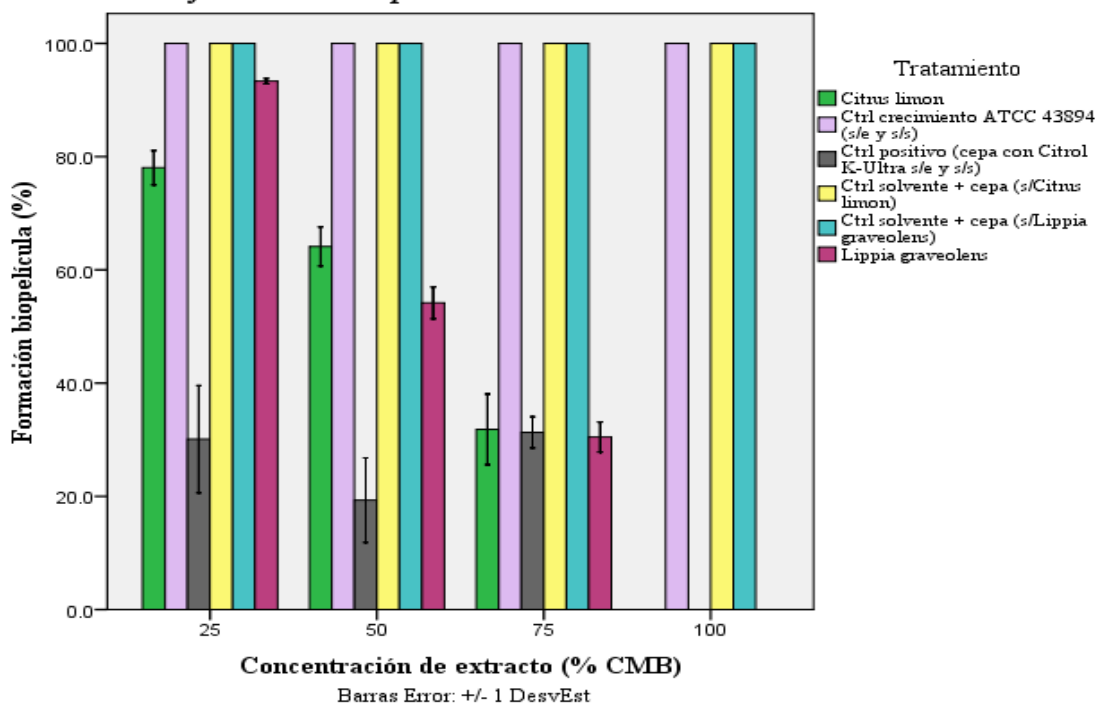


Figura. 5. Formación de biopelícula de *E. coli* O157:H7 a concentraciones subletales de *C. limon* y *L. graveolens* (s/: Sin, s/e: Sin extracto y s/s: Sin solvente).

Efecto de la mezcla de los extractos *Citrus limon* y *Lippia graveolens* sobre la formación de biopelícula de *E.coli* O157:H7

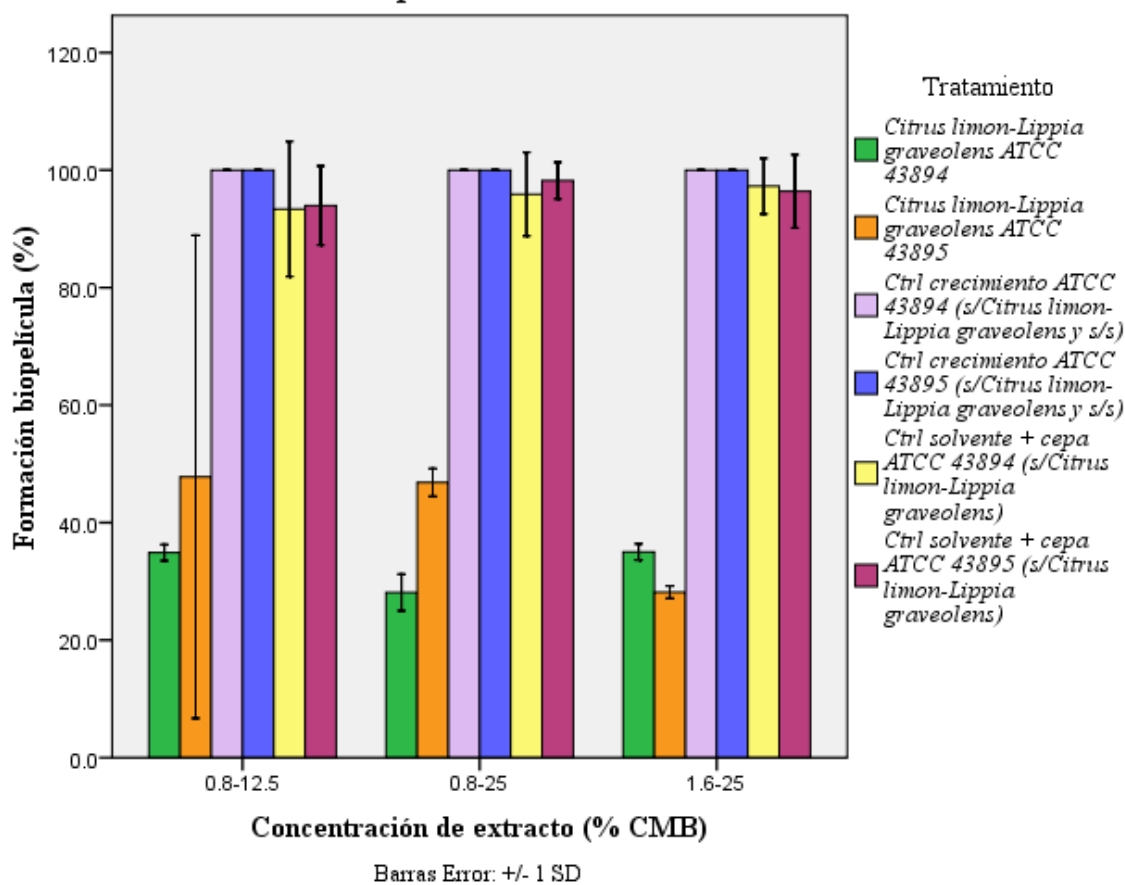


Figura. 6. Formación de biopelícula de *E. coli* O157:H7 en presencia de una mezcla de *C. limon* y *L. graveolens* (s/: Sin, s/e: Sin extracto y s/s: Sin solvente).

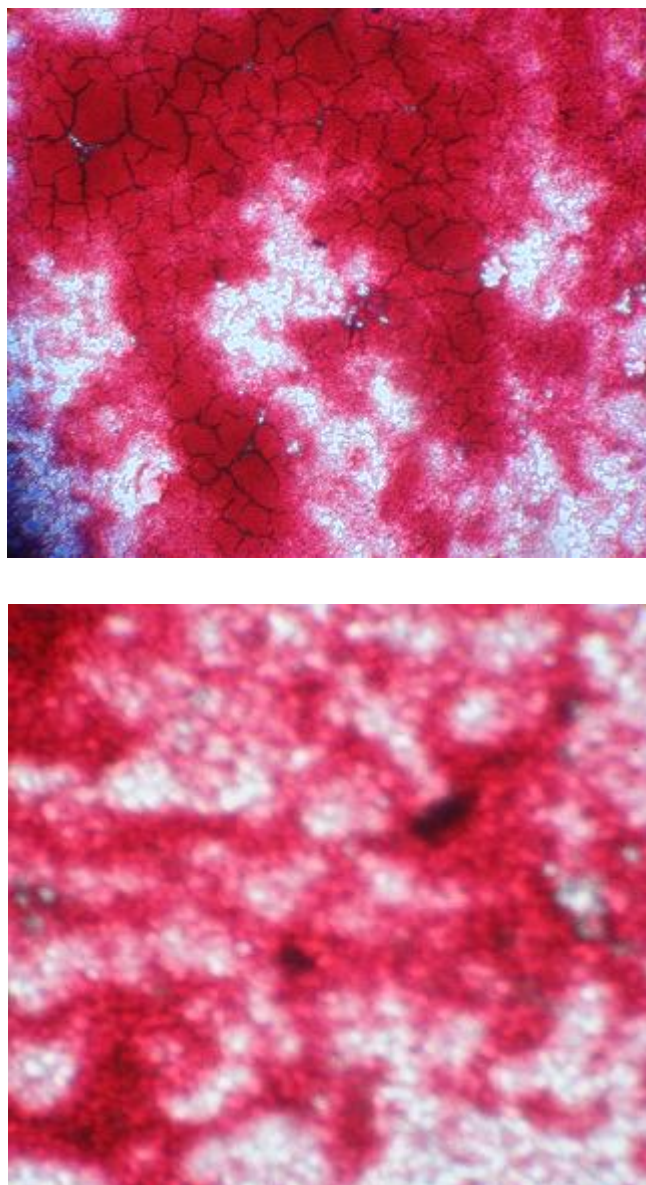


Figura 7. Fotografía de la biopelícula de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (control de crecimiento sin extracto y sin solvente) en tinción con safranina acuosa al 1%.

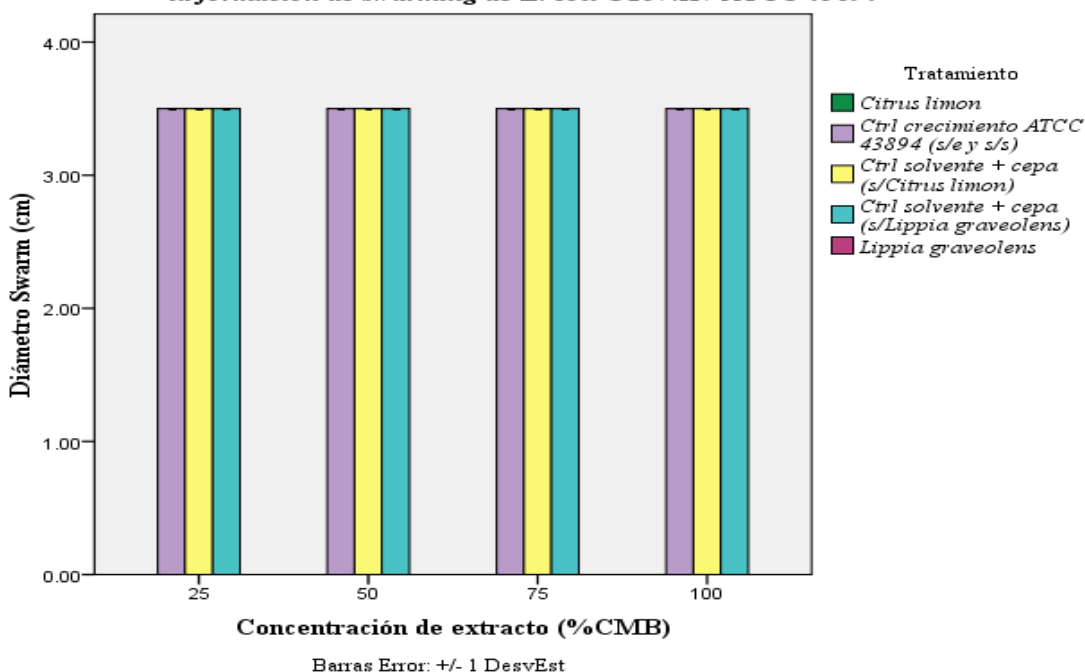
6.7 Determinación de swarming.

El ensayo de formación de swarming en las dos cepas de *E. coli* O157:H7 mostró inhibición significativa ($p \leq 0.01$) entre los tratamientos con extractos y sus respectivos controles con solvente (bacteria con solvente sin extracto) y control de crecimiento (bacteria sin solvente ni extracto) después de 24, 48 y 72 h de incubación (Figura 8). Los controles (bacteria con solvente sin extracto y bacteria sin solvente ni extracto) no presentaron diferencia significativa entre sí ($p \geq 0.01$)

Los controles mostraron formación de swarm característico a partir de las 24 h; mientras que los tratamientos con extractos mostraron inhibición completa del swarm. Entre las 48 y 72 h, los controles (bacteria con solvente y bacteria sin solvente ni extracto) alcanzan el doble del swarm obtenido a las 24 h de incubación.

Con respecto a las mezclas, se observó una inhibición del swarming ($p \leq 0.01$) entre los tratamientos y sus respectivos controles (bacteria con solvente sin extracto y bacteria sin solvente ni extracto) a las 24 h de incubación. Sin embargo no se observó diferencia significativa ($p \geq 0.01$) entre los controles con solvente y controles de crecimiento, manteniendo la misma distancia de migración de swarm. La mezcla de *C. limon* - *L. graveolens* mostró inhibición del swarm ($p \leq 0.01$) al compararlo con los tratamientos controles (bacteria con solvente sin extracto y bacteria sin solvente ni extracto) después de 48 h de incubación (Figura 9).

Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Citrus limon* y *Lippia graveolens* sobre la formación de swarming de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894



Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Citrus limon* y *Lippia graveolens* sobre la formación de swarming de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894

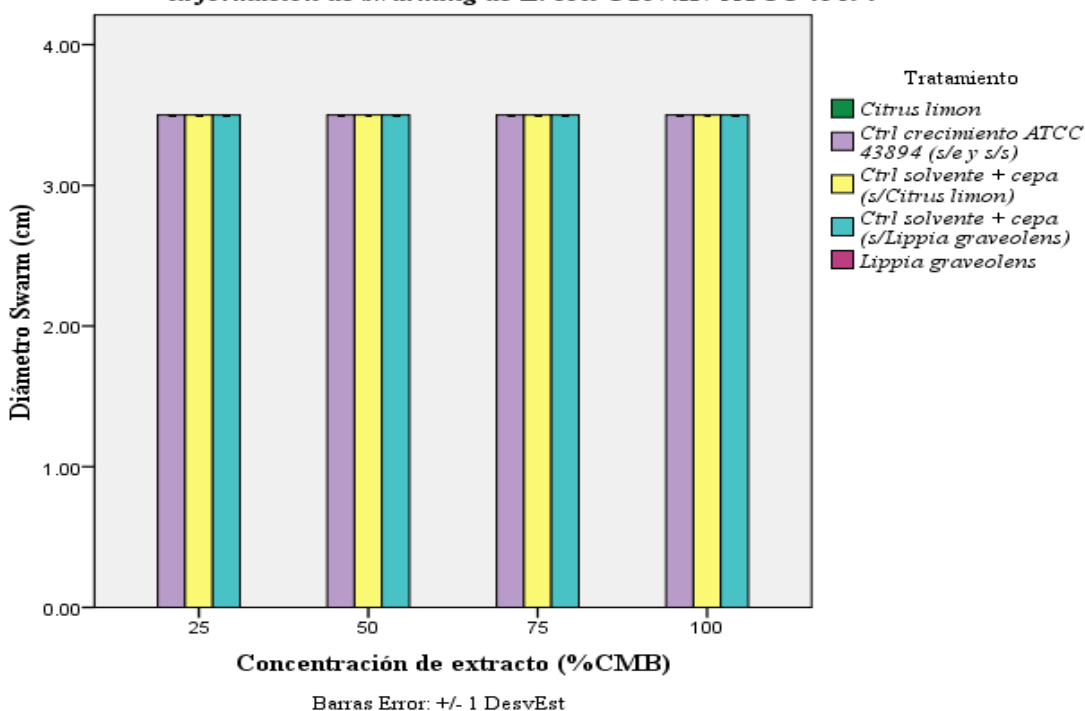


Figura 8. Efecto de los extractos de *C. limon* y *L. graveolens* sobre la formación de swarming de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 y ATCC 43895 en medio semisólido Mueller Hinton después de 24 h de incubación a 37°C (s/: Sin, s/e: Sin extracto y s/s: Sin solvente).

Efecto de la mezcla de los extractos Citrus limon y Lippia graveolens sobre la formación de swarming de E. coli O157:H7

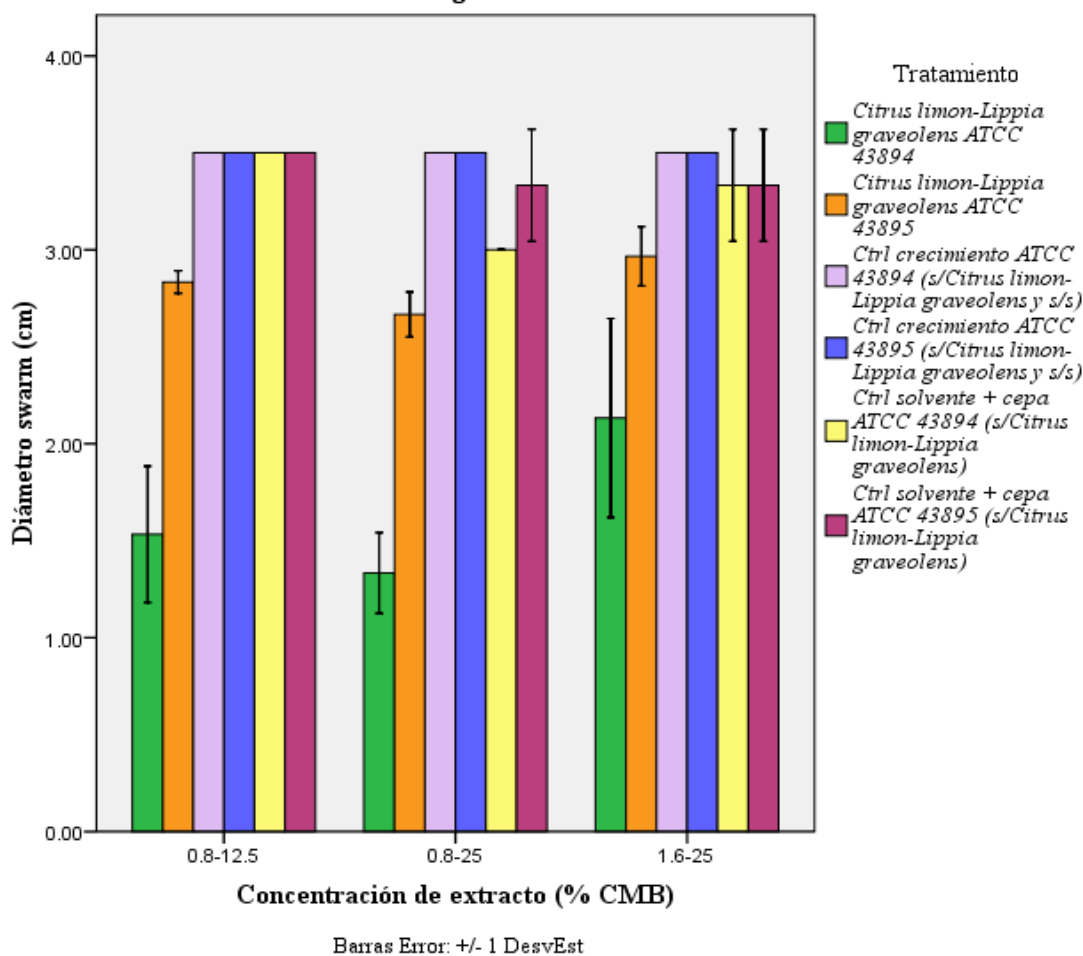


Figura 9. Efecto de la combinación de *C. limon* y *L. graveolens* sobre la formación de swarming de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 y ATCC 43895 en medio semisólido Mueller Hinton después de 24 h de incubación a 37°C.

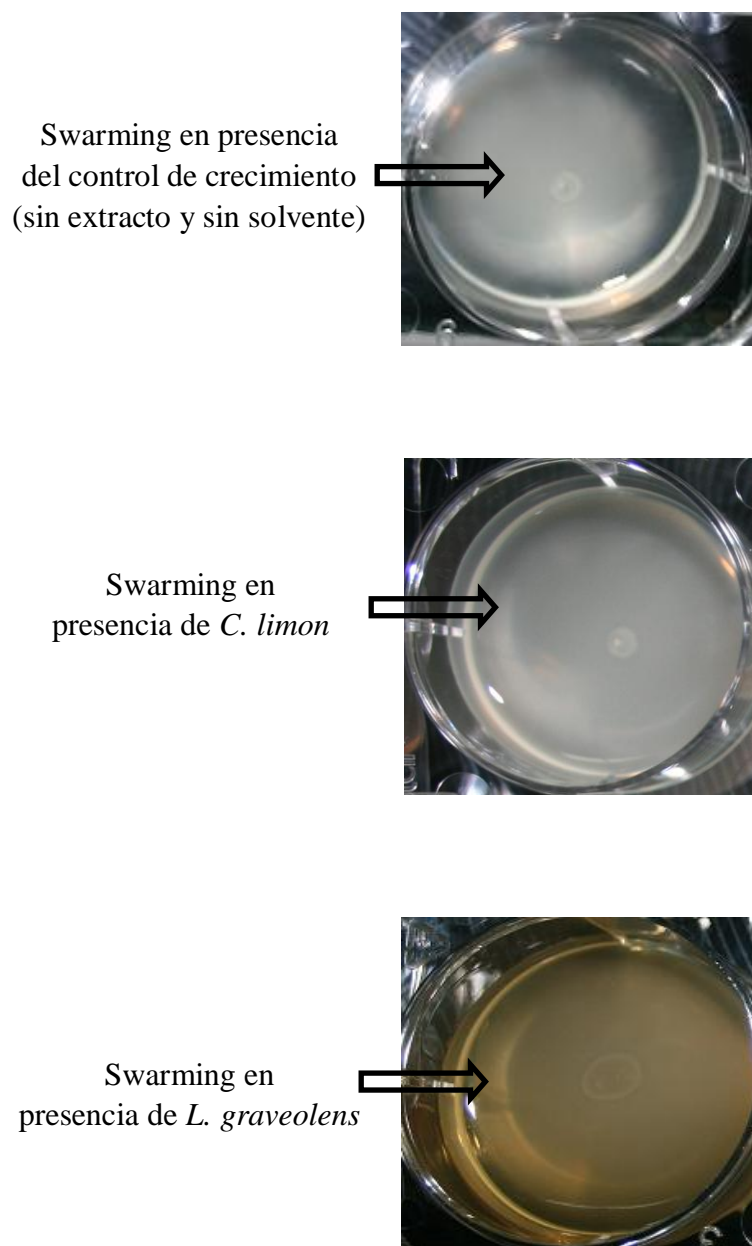


Figura 10. Formación de swarming de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 en presencia del control de crecimiento (sin extracto y sin solvente) y de los extractos de *C. limon* y *L. graveolens* después de 72 h de incubación a 37°C.

6.8 Caracterización parcial de compuestos químicos.

Se encontraron diversos grupos químicos presentes en los extractos activos analizados. Se determinó que *C. limon* presentó aldehídos y cetonas, alcaloides, carbohidratos, flavonoides, hidrocarburos insaturados y p-benzoquinonas; mientras que *L. graveolens* presentó aldehídos y cetonas, alcaloides, carbohidratos, cumarinas, flavonoides, p-benzoquinonas y taninos (Tabla 9).

Tabla 9.

Caracterización parcial de compuestos químicos presentes en los extractos elegidos.

Grupos químicos	Extractos analizados		
	<i>C. limon</i>	<i>L. graveolens</i>	Citrol K-Ultra
Aldehídos y cetonas	+	+	—
Alcaloides	+	+	+
Carbohidratos	+	+	—
Cloruros	—	—	—
Cumarinas	—	+	—
Flavonoides	+	+	—
Hidrocarburos insaturados	+	—	—
p-benzoquinonas	+	+	+
Saponinas	—	—	—
Sesquiterpenlactonas	+	—	—
Taninos	+	+	—

+ Positivo

- Negativo

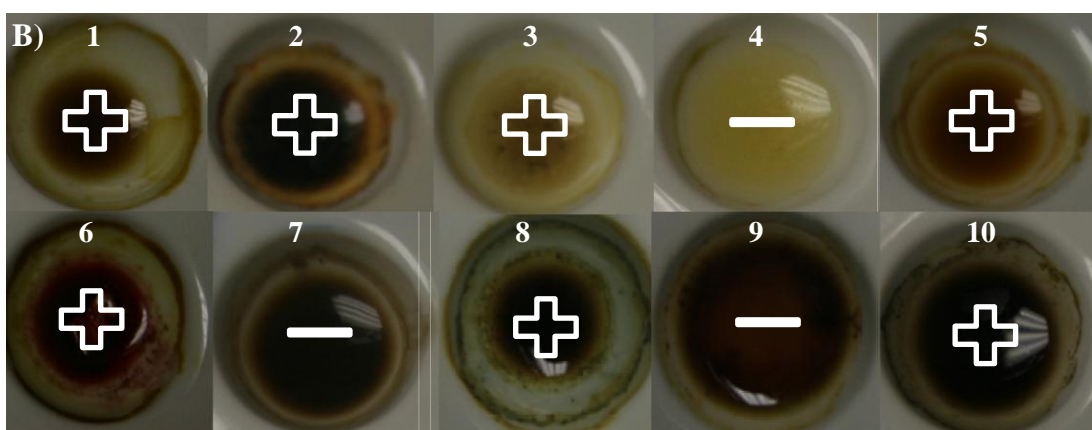
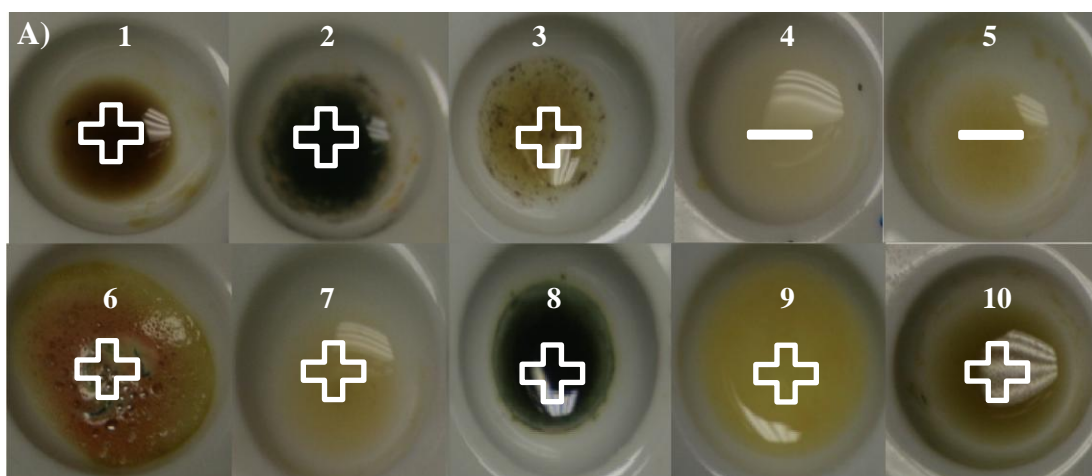


Figura 11. Caracterización parcial de compuestos químicos presentes en los extractos de A) *C. limon* y B) *L. graveolens*; en donde +: presencia y -: ausencia. Los números corresponden a 1: Aldehídos y cetonas, 2: Alcaloides, 3: Carbohidratos, 4: Cloruros, 5: Cumarinas, 6: Flavonoides, 7: Hidrocarburos insaturados, 8: p-benzoquinonas, 9: Sesquiterpenlactonas y 10: Taninos.

7. DISCUSIÓN

Desde 1970, los microbiólogos se han dado cuenta que las bacterias crecen predominantemente en forma de biopelículas en una diversidad de ambientes (Hall-Stoodley, 2004). Es en estas formas de crecimiento es donde encuentran una protección externa hacia factores de estrés como los agentes antibacterianos comúnmente usados (Davies, 2003); esta es una de las razones por las que es necesario el estudio de sustancias capaces de inhibir su formación.

Las plantas han sido ampliamente utilizadas como conservadores de alimentos, esto en base a la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana. La susceptibilidad de un microorganismo hacia una planta depende de muchos factores, como las propiedades de la planta y del microorganismo en sí (Kalemba and Kunicka, 2003).

Grosvenor (1995) estableció que las bacterias Gram positivas eran más susceptibles contra extractos de plantas en comparación con las Gram negativas. Esta propiedad puede deberse a las características morfológicas típicas de cada bacteria, ya que las Gram negativas poseen una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos, la cual las hace más impermeables a molécula lipofílicas como antibióticos hidrofóbicos, detergentes, sales biliares y tritón X-100. Además de que la membrana externa actúa como una barrera selectiva a moléculas hidrofílicas.

En nuestro trabajo se encontró que los extractos de *Citrus limon* (limón) y *Lippia graveolens* (Orégano) fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 y 43895.

El extracto etanólico de *C. limon* (limón) obtuvo una CMB de 3 mg/ml, confirmando la actividad antimicrobiana del extracto, como lo reporta Conte *et al.* (2006), al probar el extracto contra *Bacillus licheniformes*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia subpelliculosa*. La actividad antimicrobiana de las cáscaras de cítricos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ya ha sido reportada por Johann *et al.* (2007). Valtierra (2008) reportó una CMB para el extracto etanólico de *C. limon* de 8 mg/ml para *Salmonella typhi* y *S. typhimurium* y de 2 mg/ml para *Campylobacter jejuni* y *C. coli*.

Por otra parte, la CMB de *L. graveolens* (Orégano) fue de 1.5 mg/ml para ambas cepas de *E. coli* O157:H7. Estudios realizados por Friedman *et al.* (2002, 2003) con el orégano, demostraron que esta planta tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos de alimentos como *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 y *S. entérica* teniendo unos CMI en términos de reducción del 50% de las UFC de 0.19 mg/ml, 1.1 mg/ml y 1.9 mg/ml respectivamente, siendo la CMI de *E. coli* O157:H7 aproximadamente la mitad de la correspondiente a la CMB encontrada en nuestros estudios, que equivale a la eliminación del 100% de las UFC, por lo que nuestros resultados concuerdan con esos estudios.

Sin embargo, se ha reportado que una serie de factores pueden influenciar los resultados obtenidos en nuestro trabajo con respecto a los ya reportados, entre estos podemos mencionar la variabilidad en el contenido de compuestos activos de las plantas resultantes de la historia agronómica, así como diferencia en la variedad de la planta, estado de maduración, técnica de extracción (Holley *et al.*, 2005; Jordán *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 1999; Sotomayor *et al.*, 2004), características físicas y químicas de su propia actividad antimicrobiana (hidrofobicidad, volatilidad o compatibilidad con el sistema), la concentración del inóculo, especie de microorganismo y diferencias de susceptibilidad de las cepas (Davidson and Harrison, 2002; Davidson and Naidu, 2000; Hao *et al.*, 1998).

Para poder establecer el efecto de los agentes antimicrobianos es recomendable una evaluación de los extractos solos así como en combinación, para determinar la existencia de una relación sinérgica entre ellos. Una de las principales razones por las que se busca la existencia de sinergismo es para lograr potenciar la actividad bactericida de un agente que no sea muy efectivo; por lo que algunas veces se requiere la combinación de dos o más compuestos (Kiri *et al.*, 2000). Las combinaciones de antimicrobianos pueden ser seleccionadas para proveer un amplio espectro de conservación (Alzamora *et al.*, 2003) u utilización de concentraciones menores, que cuando están individualmente.

En nuestro trabajo se realizó una mezcla de los extractos etanólicos de *C. limon* y *L. graveolens* la cual resultó ser efectiva en la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7. Las combinaciones que resultaron ser efectivas presentaron un FBC entre 0.5 y 0.8, los cuales corresponden a la existencia de un efecto sinérgico. Este efecto pudiera deberse a la presencia de diferentes compuestos activos en la mezcla en comparación con su actividad individual. Mau *et al* (2001) reportaron que la mezcla de extractos de *Allium tuberosum* (cebollín chino), canela (*Cinnamomum verum*), y *Cornus officinalis* (cornel japonés) tenían amplia actividad antimicrobial que era estable frente al calor, pH extremos y un almacenaje prolongado. López-Malo (2006) reportó la actividad sinérgica entre la vainillina y el sorbato de potasio; y una actividad aditiva entre el carvacrol y el timol sobre la inhibición de *A. flavus*. Azzous and Bullerman (1982) reportaron el efecto sinérgico entre el clavo y el sorbato de potasio frente a *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. ochraceus*.

El Citrol-K-Ultra es un producto comercial utilizado como conservador y desinfectante natural. Éste producto es obtenido a partir de los extractos de cítricos como toronja, naranja y limón, y es altamente efectivo para inactivar microorganismos a una concentración de 0.4 mg/ml. En nuestros ensayos, este control (inoculo más Citrol) resultó ser efectivo para inactivar a *E. coli* O157:H7 a una concentración de 0.1 mg/ml, incluso más baja de la recomendada. Este resultado puede deberse a que el microorganismo utilizado en este estudio es más sensible que los organismos en donde se determinaron las CMB del producto.

Las bacterias planctónicas tienen la habilidad de atacar las superficies, creando una compleja comunidad bacteriana conocida como biopelícula, la cual está envuelta en una matriz de exopolisacáridos. Existen muchos factores ambientales que promueven la formación de exopolisacárido, entre ellos se encuentran alto nivel de oxígeno (Bayer *et al.*, 1990), limitada disponibilidad de nitrógeno (Jarman *et al.*, 1978; Mian *et al.*, 1978), desecación (Williams and Wimpenny, 1977; Ophir and Gutnick, 1994), baja temperatura (Troy, 1979; Junkins and Doyle, 1992) y disminución de nutrientes (Dewanti and Wong, 1995; Mao *et al.*, 2001).

En nuestra investigación, tomamos en cuenta algunos factores que pudieran influenciar la formación de biopelícula. Utilizamos condiciones adecuadas de oxígeno, temperatura, nutrientes y tiempos de incubación. También se utilizó un control que consistía únicamente de la cepa en estudio (sin tratamiento alguno), esto para poder verificar si existía o no una disminución estadística en la formación de biopelícula.

Cuando analizamos el efecto de concentraciones subletales de los extractos sobre la formación de biopelícula encontramos que a 2.25 mg/ml de *C. limon* y 1.13 mg/ml de *L. graveolens* (correspondientes al 75% de CMB) se disminuyó significativamente la formación de biopelícula en ambas cepas, estos resultados indican la presencia de compuestos químicos que pudieran estar afectando a la célula en algunos de los mecanismos involucrados específicamente en la formación de biopelícula; ya que a estas concentraciones no afectan el crecimiento bacteriano *in vitro*. Quave (2008) reportó que 0.13 mg/ml del extracto acuoso de *Leopoldia comosa* previene el 90% de la formación de biopelícula de *S. aureus*. Ryu y Beuchat (2005) observaron que el tratamiento con cloro a concentraciones superiores a los 0.2 mg/ml no eliminaba la biopelícula de *E. coli* O157:H7. Nuestros resultados difieren de los ya reportados debido a la diferencia de cepas utilizadas, tipo de planta (origen comestible), facilidad de empleo a altas concentraciones, así como su bajo costo de obtención.

Se han realizado algunos estudios que demuestran la inhibición de la formación de biopelícula de *E. coli* O157:H7 a través del uso de furanonas provenientes de algas marinas (*Delisea pulchra*) (Ren *et al.*, 2001).

En nuestro trabajo probamos mezclas de los extractos contra el desarrollo de biopelícula de *E. coli* O157:H7 utilizando para esto combinaciones inferiores a las que encontramos que tenían un efecto sinérgico (FBC menor 1). Los tratamientos mostraron una reducción de biopelícula de las cepas en estudio que fue estadísticamente significativa. No existen reportes acerca de mezclas de extractos de plantas comestibles con actividad inhibidora de biopelícula bacteriana, por lo que nuestro trabajo es novel en este aspecto.

El swarming es un proceso bacterial colectivo de asociación a las superficies; como forma de migración facilita la rápida colonización de las superficies por poblaciones bacterianas. Este tipo de motilidad ha sido asociada con la formación de biopelículas, resistencia a antibióticos y producción de factores de virulencia. Branda *et al.* (2001) encontraron que cepas silvestres de *B. subtilis* tenían defectos en la estructura de sus biopelículas, esto se debía a la deficiencia de producción de surfactina la cual es requerida para un swarming eficiente. Es por esto que en nuestro trabajo investigamos el efecto de los extractos etanólicos de *C. limon* y *L. graveolens* sobre la formación de swarming. Los ensayos fueron realizados a distintos tiempos de incubación 24, 48 y 72 h, esto con el fin de observar efectos tempranos sobre la bacteria.

Encontramos que la formación de swarming de las cepas EHEC varió con respecto al tiempo. El extracto inhibió la formación de swarm a las 24 y 48 h de incubación, mientras que para las 72 h las cepas mostraban formación de swarm, aunque en menor proporción comparada con sus controles. Estos resultados indican que para la cepa analizada las concentraciones subletales de *C. limon* y *L. graveolens* actúan como inhibidores temporales bajo las condiciones probadas. Wang *et al.* (2006) encontraron que las isoflavonas (derivados de soya) inhibieron el swarming pero no el crecimiento de *P. mirabilis*. Los resultados obtenidos pueden deberse a lo

mencionado por Li *et al.* (1993), quienes indicaron que la pérdida de motilidad bajo condiciones adversas es debida a la inhibición de la síntesis de proteínas.

Givskov *et al.* (1996) y Gram *et al.* (1996) mencionaron que las furanonas brominadas producidas como metabolitos secundarios del alga *Delisea pulchra*, inhibieron la motilidad swarming de *S. liquefaciens* y *P. mirabilis*. Wang *et al.* (2006) encontraron que el resveratrol, un compuesto fitoalexínico producido por las plantas durante el estrés por ataque de patógenos, inhibieron completamente el swarming de *P. mirabilis* a una concentración de 0.06 mg/ml.

Con respecto al efecto de las mezclas de limón-orégano sobre la formación de swarming encontramos la misma tendencia que cuando los extractos individuales fueron probados. Encontramos que las concentraciones utilizadas (inferiores a la mezcla sinérgica, ya que ésta inhibió completamente el crecimiento de la bacteria) inhibieron completamente el swarm a las 24 h, pero con el transcurso del tiempo el extracto perdía actividad permitiendo así la migración de la cepa. Estos resultados indican que la mezcla se encuentra afectando el mecanismo de migración celular aunque no afecta el crecimiento bacteriano. Hasta la fecha, no existen reportes acerca de la actividad de extractos de plantas comestibles sobre la formación de swarming, por lo que este trabajo es innovador en este ámbito.

Un posible mecanismo por el cual los extractos de limón y orégano pudieran inhibir el swarming de *E. coli* O157:H7 y la expresión de sus factores de virulencia, pudiera ser debido a que actúan mimetizando las señales de quórum sensing (QS). Existe creciente evidencia que sugiere que las plantas pueden producir una variedad de señales mimetizadas que inhiben o regulan el QS (Bauer and Robinson, 1998; Teplitski *et al.*, 2000).

Las plantas tienen la habilidad de sintetizar una ilimitada variedad de compuestos entre los que se encuentran los metabolitos secundarios. Los compuestos químicos que presentaron los extractos de limón y orégano fueron aldehídos y cetonas, alcaloides, flavonoides, hidrocarburos insaturados, p-benzoquinonas y taninos; los cuales poseen diferentes mecanismo de acción. El orégano es usado

botánicamente y es generalmente reconocido como seguro (GRAS), es utilizado como saborizante de alimentos, y su potencial contenido de ingredientes funcionales, conocidos por su actividad antimicrobiana, están ligados al contenido de fenoles (Lin *et al.*, 2005).

De acuerdo a Stern (1996), las quinonas actúan sobre la célula microbiana, las adhesinas expuestas a la superficie, los polipéptidos de la pared celular y las enzimas unidas a la membrana. Según Cushnie y Lamb (2005), los flavonoides actúan inhibiendo las enzimas. Cowan (1999) indicó que los taninos inactivan adhesinas microbianas, enzimas y proteínas de transporte.

Existen muchos reportes acerca de la actividad antimicrobiana de compuestos naturales sobre *E. coli* O157:H7; la mayoría de ellos indican que la actividad de los extractos parece estar ligada a la presencia de compuestos fenólicos, los cuales están involucrados con la disrupción de la membrana citoplásmica, la fuerza protón motriz, el flujo de electrones, el transporte activo, además de causar coagulación del contenido celular (Burt 2004; Delaquis *et al.*, 2002). El mecanismo de acción de la actividad antimicrobiana de compuestos naturales parece ser más específica dependiendo de su concentración (Friedman *et al.*, 2002).

De acuerdo con nuestros resultados, existe evidencia que algunos extractos de plantas contienen un perfil de compuestos inhibitorios del desarrollo de biopelícula de *E. coli* O157:H7. Sin embargo el mecanismo molecular por el cual nuestros extractos inhiben el desarrollo de biopelícula y la formación de swarming no está completamente claro, por lo que se abre una oportunidad de desarrollo para elucidar los mecanismos de acción de los extractos sobre nuestra bacteria.

En síntesis, los resultados encontrados en este trabajo de investigación revelan que dos de las 36 plantas usadas en este estudio tuvieron efecto inhibitorio sobre el desarrollo de biopelícula de *E. coli* O157:H7 y algunos de sus procesos relacionados, como el crecimiento bacteriano y la formación de swarm; por lo que se acepta la hipótesis planteada en este proyecto.

8. CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de *Citrus limón* y *Lippia graveolens* probados poseen un efecto antimicrobiano contra *Escherichia coli* O157:H7 con valores de CMB de 3 y 1.5 mg/ml respectivamente.

Las concentraciones subletales de la CMB (25, 50 y 75%) de los extractos de *Citrus limón* y *Lippia graveolens* no afectaron significativamente la concentración bacteriana de *Escherichia coli* O157:H7.

La mezcla de *Citrus limón* y *Lippia graveolens* presentó una actividad sinérgica, inhibiendo completamente el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7.

Los extractos etanólicos de *Citrus limón* y *Lippia graveolens* y la mezcla de éstos, inhibieron el desarrollo de biopelícula de *Escherichia coli* O157:H7.

Los extractos etanólicos de *Citrus limon* y *Lippia graveolens* y la mezcla de éstos inhibieron la formación del swarming de *Escherichia coli* O157:H7 después de 24 h de incubación a 37°C.

LITERATURA CITADA

Achen M. and Yousef A. E. 2001. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. J. Food Sci. 66: 1380-1384.

Adame J. and Adame H. 2000. Plantas curativas del noreste mexicano. Castillo: México.

Adler J. 1966. Chemotaxis in Bacteria. Science. 153: 708-716

Alarcón G. 2000. Análisis de la actividad antimicrobiana de 48 plantas medicinales o comestibles contra bacterias de importancia en alimentos. Tesis (Licenciatura) FCB, UANL.

Alberti L. and Harshey R. M. 1990. Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. J Bacteriol. 172: 4322-4328.

Allison C. and Hughes C. 1991. Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behavior. Science Progress Edinburgh. 75: 403-422.

Allison C., Lai H. C., and Hughes C. 1992. Coordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. Mol Microbiol. 6:1583-1591.

Alzamora, S. M., López-Malo A., Guerrero S., and Palou E. 2003. Plant antimicrobials combined with conventional preservatives for fruit products. In: Antimicrobials for the minimal processing of foods, S. Roller (ed.). Natural. Woodhead Publishing Ltd., London, pp. 235-249.

An Y. H. and Friedman R. J. 2000. Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications. Humana Press, Totowa, N. J.

Anonymous. 2006. *Listeria*-specific bacteriophage preparation. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. 21 CFR Part 172.785. Fed. Regist. 71: 47729-47732.

Anonymous. 2007. Agency response letter, GRAS notice no. GRN 000218. Center for Food Safety and Applied Nutrition, U. S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD.

Azzous M. A. and Bullerman L. B. 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. J Food Prot. 45: 1298-1301.

Baqui A. H., Sack R. B., and Black R. E. 1992. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children <5 years of age. J Infect Dis. 166: 792-796.

Basaran N., Quintero-Ramos A., Moake M. M., Churey J. J., and Worobo R. W. 2004. Influence of Apple cultivar son inactivation of different strains of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider by UV irradiation. J Appl Environ Microbiol. 70: 6061-6065.

Bauer W. D., and Robinson J. B. 2002. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. Curr Opin Biotechnol. 13: 234-237.

Baydar H., Sagdic O., Özkan G., and Karadogan T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. Food Control. 15: 169-172.

Bayer A. S., Eftekhar F., Tu J., Nast C.C., Speert D. P. 1990. Oxygen-dependent up-regulation of mucoid exopolysaccharide (alginate) production in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 58: 1344-1349.

Beutin L., Krause G., Zimmermann S., Kaulfuss S., and Gleier K. 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol.* 42: 1099-1108.

Blackman I. C. and Frank J. F. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *J Food Prot.* 59: 827-831.

Bowles B. L. and Miller A. J. 1993. Antibotulinal properties of selected aromatic and aliphatic aldehydes. *J Food Prot.* 56: 788-794.

Bowles B. L., Sackitey S. K., and Williams A. C. 1995. Inhibitory effects of flavor compounds on *Staphylococcus aureus* WRRC B124. *J Food Saf.* 15: 337-347.

Boyce TG, Swerdlow DL, Griffin PM. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med.* 333: 364-368.

Branda S. S., Gonzalez-Pastor J. E., Ben Yehuda S., Losick R., and Kolter R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11621-11626.

Brandl M.T. 2008. Plant Lesions Promote the Rapid Multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on Postharvest Lettuce. *Appl Environ Microbiol.* 5285-5289.

Brauner A., Katouli M., and Ostenson C. G. 1995. P-fimbriation and haemolysin production are the most important virulence in diabetic patients with *Escherichia coli* bacteraemia: A multivariate statistical analysis of seven bacterial virulence factors. *J Infect.* 31: 27-31.

Buchanan R.L. and Doyle M.P. 1997. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *J Food Technol.* 51(10):69-76.

Buck G. E, Kelly M.T. 1982. Susceptibility testing of *Campylobacter fetus* subsp. *Jejuni*, using broth microdilution panels. *Antimic Ag Chemoter.* 21 (2): 274-277.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods —a review. *Int J Food Microbiol.* 94: 223-253.

Calderwood S. B., Acheson W. K., Keusch G. T., Barrett T. J., Griffin N. A., Strockbine A., Swaminathan B., Kaper J. B., Levine M. M., Kaplan B. S., Karch CH., O'Brien A. D., Obrig T. G., Takeda Y., Tarr P.L., and Wachsmuth I. K. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News*. 62: 118-119.

Campbell A. 2003. The future of bacteriophage biology. *Nat. Rev. Genet.* 4:471-477.

Castillo S. L. 2008. Productos naturales de plantas como inhibidores de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*: Estudio sobre actividad biológica y mecanismo de acción. Tesis (Maestría). Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2008. Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases (DFBMD). *Escherichia coli*. [Internet]. Disponible en el sitio de red: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html [Revisado el 9 de septiembre de 2009].

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- 10 Sites, United States, 2004. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5414a2.htm> [Revisado el 9 de enero de 2009].

Cho W. I., Choi J. B. Lee K, Chung M. S, Pyun Y. R. 2008. Antimicrobial activity of torilin isolated from *Torilis japonica* fruit against *Bacillus subtilis*. *J. Food Sci.* 73(2): M37-M46.

Conte A., Speranza B., Sinigaglia M., Del Nobile M. A. 2006. Effect on lemon extracto n foodborne microorganism. *J Food Prot.* 70(8): 1896-1900.

Cooper R. Morre J., and Morre D. 2005. Medicinal benefits of green tea. Part II. Review of anticancer properties. *J. Altern. Complement. Med.* 11: 639-652.

Cordula Lembke, Podbielski Andreas, Hidalgo-Grass Carlos, Jonas Ludwing, Hanski Emanuel, and Kreikemeyer Bernd. 2006. Characterization of Biofilm Formation by Clinically Relevant Serotypes of Group A Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 2864-2875.

Costerton, J. W. 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Indus. Microbiol.* 15:137-140

Cotter P. A., and Miller J. F. 1998. *In vivo* and *ex vivo* regulation of bacterial virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol.* 1: 17-26.

Danese, P. N., Pratt, L. A. and Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 182(12): 3593-6.

Darfeuille-Michaud A., Aubel D., Chauviere G., Rich C., Bourgues M., Servi A., and Joly B. 1990. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Inf Immun.* 58: 893-902.

Davicino R., Mattar M. A., Casali Y. A., Corre S. G., Pettenati E. M. y Micalizzi B. 2007. Actividad antifungica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista peruana de Biología.* 14(2): 247-251.

Davidson, P.M. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, M. P. Beuchat and L. R. Montville (ed.), 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C. pp. 593-628.

Davidson, P. M. and Naidu A. S. 2000. Phyto-phenols. In: *Natural food antimicrobial systems*, A. S. Naidu (ed.). CRC Press, Boca Raton, Fla. Pp. 265-294.

Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2: 114-122.

Debeer D., Stoodley P., and Lewandowski. 1996. Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Res.* 30: 2761-2765.

DeFlaun M. F., Marshall B.M., Kulle E. P., Levy S. B. 1994. Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas fluorescens* defective in adhesion to soil and seeds. *Appl Environ Microbiol.* 60: 2637-2642.

Defoirdt T., Crab R., Wood T. K., Sorgeloos P., Verstraete W., and Bossier P. 2006. Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 72: 6419-6423.

Deibel Virginia. 2000. Biofilms. *J Food Safety*, V1, 6-7

Delaquis P. J., Stanich K., Girard B., and Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol.* 74: 101-109.

DeLisa M. P., Wu C-F., Wang L., Valdes J. J., and Bentley W. E. 2001. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183: 5239-5247.

De Martinis E. C. P., Públío M. R. P., Santarosa P. R., and Freitas F. Z. 2001. Antilisterial activity of lactic bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat products. *Braz J Microbiol.* 32: 32-37.

DeQueiroz G. A. and Day D. F. 2007. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *J Appl Microbiol.* 103: 794-802.

Dewanti R., and Wong A. C. L. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* 26: 147-164.

Djordjevic D., Wiedmann M., and McLandsboroufg L.A. 2002. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2950-2958.

Domenico P., Baldassarri L., Schoch P. E., Kaehler K., Sasatsu M. and Cunha B. A. 2001. Activities of Bismuth Thiols against Staphylococci and Staphylococcal Biofilms. *J Antimic Ag Chemother.* 1417-1421

Domingo D. y López M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioter.* 16: 385-393.

Domínguez, X. A. 1988. Métodos de investigación Fitoquímica. Limusa (eds). México, pp. 39-43.

Donlan Rodney M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infec. Dis.* 8: 881-890.

Dorak T. 2005. Real time PCR. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html> [Revisado el 12 de enero de 2010].

Dworkin M. 1983. Tactic behaviour of *Myxococcus xanthus* does not respond chemotactically to moderate concentration gradients. *J Bacteriol.* 154: 437-442.

Eberl L., Molin S., and Givskov M. 1999. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol.* 181:1703-1712.

Eberl L., Winson M. K., Sternberg C. 1996. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol.* 20: 127-136.

Edwards P. R. and Ewing W. H. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn.

Enache E., and Chen Y. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in cranberry juice concentrates at different °Brix levels. *J Food Prot.* 70: 2072-2077.

Escobar M. A., García S. y Heredia N. 2003. Actividad de Extractos de Plantas Medicinales sobre el crecimiento, la producción de verotoxinas y la adhesión de *E. coli* O157:H7. Congreso de inocuidad alimentaria. Monterrey, N.L. Noviembre 24-26.

Falcone P. M., Mastromatteo M., Del Nobile M. A., Corbo M. R. and Sinigaglia M. 2007. Evaluating in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene-indicating and pathogenic bacteria. *J Food Prot.* 70: 425-431.

Farkas J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food- A review. *Intl J Food Microbiol.* 44: 189-204

Feng P. 2001. *Escherichia coli*. In: Guide to Foodborne pathogens, Wiley J and Sons (ed.). United States, pp. 143-162.

Fontes M., and Kaiser D. 1999. Myxococcus cells respond to elastic forces in their substrate. Proc Natl Acad Sci. USA. 96: 8052-8057.

Foulquie-Moreno M. R., Rea M. C., Cogan T. M., and De Vuyst L. 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. Int J Food Microbiol. 81: 73-84.

Frankel G., Philips A. D., Rosenshine I., Dougan G., Kaper J. B., and Stuart. 1998. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: More subversive elements. Mol Microbiol. 30: 911-921.

Fraser G. M., and Hughes C. 1999. Swarming motility. Curr Opin Microbiol. 2:630-635.

Friedman M. 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. Mol Nutr Food Res. 51: 116-134.

Friedman M, Henika P. R, Mandrell R. E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J Food Prot. 65: 1545-1560.

Friedman M, Henika P. R, Mandrell R. E. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. J Food Prot. 66(10): 1811-1821.

FSIS (Food Safety and Inspection Service) U.S. Department of Agriculture. 1998. Preliminary Pathways and Data for a Risk Assessment of *E. coli* O157:H7 in Beef. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.fsis.usda.gov/ophs/ecolrisk/prelim.htm> [Revisado el 22 de abril del 2010].

Garo E., Eldridge G. R., Goering M. G., DeLancey P. E., Hamilton M. A., Costerton J. W., and James G. A. 2007. Asiatic Acid and Corsolic Acid Enhance the Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Tobramycin. *J Antimicrob Chemother.* 1813-1817.

Ghelardi E., Celandroni F., Salvetti S., Beecher D. J., Gominet M., Lereclus D., Wong A. C. L., and Senesi S. 2002. Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol.* 184: 6424-6433.

Gill A.O., and Holley R. A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol.* 108: 1-9.

Givskov M., Eberl L., Christiansen G., Benedik M. J., and Mollin S. 1995. Induction of phospholipase and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon *flhD*. *Mol Microbiol.* 15: 445-454.

Graf J., Dunlap P. V., Ruby E. G. 1994. Effect of transposition-induced motility mutations on colonization of the host light organ by *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol.* 176: 6986-6991.

Gram L., de Nys R., Maximilien R., Givskov M., Steinberg P. and Kjelleberg S. 1996. Inhibitory effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* on swarming motility of *Proteus mirabilis*. *Appl and Environ Microbiol.* 62:4284-4287.

Greer G. G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J Food Prot.* 68: 1102-1111.

Griffin P. M. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Infections of the gastrointestinal tract*, M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg, and R. L. Guerrant (ed.). Raven Press, New York, NY. pp. 739-761.

Griffin P. M., Blaser M. J., Smith P. D., and Ravdin J. I. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Gastr Tract.* Raven Press. 739-761.

Griffin PM, Tauxe RV. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev.* 13:60-68.

Grosvenor P. W., Supriono A., and Gray D. O. 1995. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: Antibacterial and antifungal activity. *J Ethnopham.*

Hall-Stoodley L., Costerton J. W., and Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2: 95-108.

Harrison J. J., Turner R. J., Joo Daniel A., Stan M. A., Chan C. S., Allan N. D., Vrionis H. A., Olson M. E., and Ceri H.. 2008. Copper and Quaternary Ammonium Cations Exert Synergistic Bactericidal and Antibiofilm Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimic Ag Chemother.* 2870-2881.

Harshey R. M., and Matsuyama T. 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 91:8631-8635.

Harshey R. M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol.* 57: 249-273.

Hartland E. L., Batchelor M., Delahay R. M., Hale C., Matthews S., Dougan G., Knutton S., Connerton I., y Frankel G. 1999. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to tir and the host cells. *Mol Microbiol.* 32: 151-158.

Hazelbauer G. L., Berg H. C., and Matsumura P. Bacterial motility and signal transduction. 1993. *Cell.* 73: 15-22.

Hentzer M. and Givskov M. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* 112: 1300-1307.

Hu J-F., Garo E., Goering M. G., Pasmore M., Yoo H-D., Esser T., Sestrich J., Cremin P. A., Hough G. W., Perrone P., Lee Y. S. L., Le N-T., O'Neil-Johnson M., Costerton J. W., and Eldridge G. R. 2006. Bacterial Biofilm Inhibitors from *Diospyros dendo*. *J Nat Prod.* 69, 118-120.

James J. Sims, Donnell Mark S., Leary John V. and Lacy George H. 1975. Antimicrobial Agents from Marine Algae. *J Antimic Ag Chemother.* 320-321.

Jarman T. R., Deavin L., Slocombe S., Righelato R. C. 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol.* 107: 59-64.

Jessica O. R., Alberti L., and Harshey R. M. 1992. Mutations that impair swarming motility in *Serratia marcescens* 274 include but are not limited to those affecting chemotaxis or flagellar function. *J Bacteriol.* 174: 6125-6137.

Jordán M. J., Martínez R. M, Cases M. A., and Sotomayor J. A. 2003. Watering level effect on *Thymus hyemalis* Lange essential oil yield and composition. *J Agric Food Chem.* 51:5420-5427.

Jubete Y., Zabala J.C., Juarez A., de la Cruz F., 1995. *hlyM*, a transcriptional silencer downstream of the promoter in the *hly* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 177: 242-246.

Juneja V. and Friedman M. 2007. Carvacrol, cinnamaldehyde, oregano oil, and thymol inhibit *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth in ground turkey during chilling. *J Food Prot.* 70: 218-222.

Junkins A. D., and Doyle M. P. 1992. Demonstration of exopolysaccharide production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* 65: 3048-3055.

Kaiser D. 2004. Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 58: 75-98.

Karmali M. A., Lingwood C. A., Petric M., Brunton J., and Gyles C. 1996. Maintaining the existing phenotype nomenclatures for *E. coli* cytotoxins. *ASM News.* 62: 167-169.

Keenedy J. E., Oblinger J. L., and Bitton G. 1984. Recovery of coliphages from chicken, pork sausage, and deli meats. *J Food Prot.* 47: 623-626.

Keenedy J. E., Wei C. I., and Oblinger J. L. 1986. Characterization of coliphages recovered from foods according to temperature of infectivity. *J Food Prot.* 49: 952-954.

Keener KM, Bashor MP, Curtis P. A, Sheldon BW, Kathariou S. 2004. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Rev Food Sci Food Safety.* 3: 105-116.

Khadre M. A., Yousef A. E., and Kim J. G. 2001. Microbiological aspects of ozone application in food: a review. *J Food Sci.* 66: 1-11.

Khan M. S. A., Zahin M., Hasan S., Husain F. M. and Ahmad I. 2009. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Lett Appl Microbiol.* 49: 354-360.

Kim J. G. Yousef A. E., and Khadre M. H. 2003. Ozone and its current and future application in the food industry. In *Advances in food science and nutrition*, S. Taylor (ed.). Elsevier Science Ltd., London. Vol. 45. Pp. 167-218.

Kim S. C., Ruengwilysup, and Fung D. Y. C. 2004. Antibacterial effect of water-soluble tea extracts on foodborne pathogens in laboratory medium and in food model. *J Food Prot.* 67: 2608-2612.

Kim T-J., Young B.M., and Young G.M. 2008. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 5466-5474.

Kiri N. Archer G., Climo M. W. 2002. Combinations of Lysostaphin with β -lactams are synergistic against oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimic Ag Chemother.* 46(6): 2017-2020.

Knowles J. and Roller S. 2001. Efficacy of Chitosan, Carvacrol and a Hydrogen Peroxide Based Biocide against Foodborne Microorganisms in Suspension and Adhered to Stainless Steel. *J Food Prot.* 1542-1548.

Komulainen H. 2004. Experimental cancer studies of chlorinated by products. *J Toxicol.* 198:239-248.

Kong, B., Wang J., and Xiong Y. L. 2007. Antimicrobial activity of several herb and spice extracts in culture medium and in vacuum packaged pork. *J Food Prot.* 70:641-647

Korber D. R., Lawrence J. R., Sutton B., Caldwell D. E. 1989. The effect of laminar flow on the kinetics of surface recolonization by mot⁺ and mot⁻ *Pseudomonas fluorescens*. *Microb Ecol.* 18: 1-19.

Korber D. R., Lawrence J. R., Caldwell D. E. 1994. Effect of motility on surface colonization and reproductive success of *Pseudomonas fluorescens* in dual-dilution continuous culture and batch culture systems. *Appl Environ Microbiol.* 60: 1421-1429.

Koseki S., Yoshida K., Kamitani Y., and Itoh K. 2003. Influence of inoculation method, spot inoculation site, and inoculation size on the efficacy of acidic electrolyzed water against pathogens on lettuce. *J Food Prot.* 66:2010-2016.

Kraigsley A., Ronney PD., Finkel SE. 2000. Dynamics of self-propagating fronts of motile bacteria. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/BacterialFronts.html> [Revisado el 26 de enero del 2010].

Kusumaningrum H. D., G. Riboldi, W.C. Hazeleger and R. R. Beumer. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int J Food Microbiol.* 85: 227-236.

Lawrence J. R., Delaquis P. J., Korber D. R., Caldwell D.E. 1987. Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microb Ecol.* 14: 1-14.

Lee J., Bansal T., Jayaraman A., Bentley W. E., and Wood T. K. 2007. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Biofilms are Inhibited by 7-Hydroxyindole and Stimulated by Isatin. *Appl Environ Microbiol.* 4100-4109.

Lee K-M., Kim W-S., Lim J., Nam S., Youn M., Nam S-W., Kim Y., Kim S-H., Park W., and Park S. 2009. Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot.* 72: 325-331.

Lee S-Y., Gwon S-Y., Kim S-J., and Moon B. K. 2009. Inhibitory effect of commercial green tea and rosemary leaf powders on the growth of foodborne pathogens in laboratory media and oriental style rice cakes. *J Food Prot.* 72: 1107-1111.

Lemay MJ, Choquette J, Delaquis P, Gariépy C, Rodrigue N, Saucier L. 2002. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken model. *Int J Food Microbiol.* 78: 217-226.

Lemon Katherine P., Higgins Darren E., and Roberto Kolter. 2007. Flagellar Motility is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *J Bacteriol.* 4418-4424.

Lerliche V., Chassaing D., and Carpentier B. 1999. Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol.* 51: 169-182.

Levine M. M., Ristaino P., Marley G., Smyth C., Knutton S., Boedeker E., Black R., Young C., Clements M. L., Cheney C., and Patnaik R. 1984. Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans. *Infect Immun.* 44: 409-420.

Lewis K. 2001. Riddle of Biofilm Resistance. *J Antimic Ag Chemother.* 999-1007.

Liaw S-J., Lai H-C., Ho S-W., Lu K-T., and Wang W-B. 2003. Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *J Med Microbiol.* 52: 19-28.

Li C., Louise C. J., Shi W., and Adler J. 1993. Adverse conditions which cause lack of flagella in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 175: 2229-2235.

Lin Y. T., Kwon Y. I., Labbe R. G., and Shetty K. 2005. Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by oregano and cranberry phytochemical synergies. *Appl Environ Microbiol.* 71: 8558-8564.

Lindum P. W., Anthoni U., Christophersen C., Eberl L., Molin S. and Givskov M. 1998. *N-Acyl-L-homoserine* lactone autoinducers control production of an

extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol.* 180: 6384-6388.

Lior H. 1996. Classification of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans, C. L. Gyles (ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. Pp.31-72.

Lominski I. and Lendrum A. C. 1947. The mechanism of swarming of *Proteus*. *J Path Bacteriol.* 59: 688-691.

López-Malo A., Alzamora S. M., and Guerrero S. 2000. Natural antimicrobials from plants. In: *Minimally processed fruits and vegetables: fundamental aspects and applications*, S. M. Alzamora, M. S. Tapia, and A. López-Malo (ed.). Aspen Publishers, Gaithersburg, Md. Pp.237-264.

López-Malo A., Alzamora S. M., and Palou E. 2005. Naturally occurring compounds plant sources. In: *Antimicrobials in food*, P. M. Davidson, J. N. Sofos, and A. L. Branen (ed.), 3rd ed. CRC Press, New York. Pp. 429-451.

López-Malo A., Palou E., León-Cruz R., and Alzamora S. M. 2006. Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. In: *Advances in experimental medicine and biology*, Hocking A. D., Pitt J. I., Samson R. A., and Thrane U. Vol. 571. Springer, NY. Pp. 261-285.

Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. 2002. Comparison of broth microdilution, E test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol.* 41(3): 1062-1068.

Luciano F. B., Hosseinian F. S., Beta T., and Holley R. A. 2008. Effect of free-SH containing compounds on allyl isothiocyanate antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci.* 73: 214-220.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. Brock, *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall, pp. 952-953.

Margall N., Domínguez Á., Prats G. y Salleras L. 1997. *Escherichia coli* henterohemorrágica. *Rev Esp Salud Pública.* 71: 437-443.

Marino M., Bersani C., and Comi G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J Food Prot.* 62: 1017- 1023.

Maselli A., Rosales L. C. y Guevara Y. Uso de extractos vegetales sobre *Xanthomonas phaseoli*, causante de la quemazón en *Phaseolus vulgaris* L. [Internet]. Disponible en el sitio de red:
<http://www.ceniap.gov.ve/>
[Revisado el 15 de julio de 2009].

Mao Y., Doyle M. P., Chen J. 2001. Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 183: 3811-3815.

Mau J. L., Chen C. P., and Hsieh P. C. 2001. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and corni fructus. *J Agric Food Chem.* 49: 183-188.

McKay D. L., and Blumberg J. B. 2002. The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr.* 21: 1-13.

Mead P.S., Slutsker L., Dietz V. McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C. Griffin P.M., and Tauxe R. V. 1999. Food-related illness and death in the United State. *Emerg Infect Dis.* 5:607-625.

Mian F. A., Jarman T. R., Righelato R. C. 1978. Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 134: 418-422.

Midelet G. and Carpentier B. 2002. Transfer of Microorganisms, Including *Listeria Monocytogenes*, from Various Materials to Beef. *Appl Environ Microbiol.* 4015-4024.

Miles, A.A. and Mishra S.S. 1932. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hig.* 38:732.

Mills A. L. and Powelson D. K. 1996. Bacterial interactions with surfaces in soil. In *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. Fletcher M. (ed). New York: John Wiley and Sons. Pp 25-27.

Mittelman W. Marc. 1998. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. *J Dairy Sci.* 81:2760-2764.

Moretro Trond, Hermansen Lene, Holck Askild L., Sidhu Maan S., Rudi Knut and Langsrud Solveig. 2003. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among Staphylococci from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol.* 69: 5648-5655.

Naidu, A. S. 2000. Overview. In: Natural food antimicrobial systems, A. S. Naidu (ed.). CRC Press, Boca Raton, Fla. Pp. 19-102.

Nataro J. P. and Kaper J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201.

Nevas, M., Korhonen A. R. Lindström M., Turkki P., and Korkeala H. 2004. Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *J Food Prot.* 67: 199-202.

Nisa I., Wolf E., Hansiki E. and Rosenshine Y. 1998. Interaction of *Escherichia coli* with host epithelial cells. *Folia Microbiol.* 43: 247-252.

Niu C., and Gilbert E. S. 2004. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. *Appl Environ Microbiol.* 69:6951-6956.

Nogueira M. C., Oyarzabal O. A., and Gombas D. E. 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in cranberry, lemon, and lime juice concentrates. *J Food Prot.* 66: 1637-1641.

Nychas, G. J. E., Tassou C., and Skandamis P. N. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. In: Natural antimicrobials for the minimal processing of foods, S. Roller (ed.). CRC Press, Boca Raton, Fla. Pp. 176-200.

O'Brien A. D., and Holmes R. K. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev.* 51: 206-220.

O'Brien A. D., and Holmes R. K. 1996. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.

O'Brien A. D., Tesh V. L., Donohue-Rolfe A., Jackson M. P., Olsnes S., Sandving K., Lindberg A. A., and Keusch G. T. 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 180: 65-94.

Ophir T., and Gutnick D. L. 1994. A role of exopolysaccharide in the protection of microorganisms from dessication. *Appl Environ Microbiol*. 60: 740-745.

Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. 2005. Synergy test by E test and Checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clinic Microbiol*. 43(1): 140-143.

O'Toole. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 54: 49-79.

Otteman K. M. and Miller J. F. 1997. *Mol Microbiol*. 24, 1109-1117.

Oyarzabal O. 2006. Antimicrobianos para controlar *Campylobacter* en broilers. *AP World Poultry*. 24(8): 18-20.

Park C. H., Hixon D. L., Morrison W. L., and Cook C. B. 1994. Rapid diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 directly from fecal specimens using immunofluorescence stain. *Am J Clin Pathol*. 101: 91-94.

Parrilla Cerrillo M. C., Vázquez Castellanos J.L., Saldade Castañeda E. O., Nava Fernández L. M. 1993. Brotes de Toxiinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y Parasitario. *Rev Mex Salud Pública*. 35: 456-463.

Parsek M. R. and Fuqua C. 2004. Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface- Associated Microbial Life. *J Bacteriol*. 4427-4440.

Persson T., Hansen T. H., Rasmussen T. B., Skinderso M. E., Givskov M. and Nielsen J. 2005. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org Biomol Chem.* 3, 253-262.

Poitrineau P., Forestier C., Meyer M., Jallat C., Rich C., Malpuech G., and De Champs C. 1995. Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 33: 1961-1962.

Proyecto de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-PESC-2004, que regula el uso de antimicrobianos en el cultivo de crustáceos en la república mexicana.

Quave C. L., Plano L. R. W., Pantuso T. and Bennett B. C. 2008. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharm.* 118: 418-428.

Quintero-Ramos A., Churey J. J., Hartman P., Barnard J., and Worobo R. W. 2004. Modeling of *Escherichia coli* inactivation by UV irradiation at different pH values in apple cider. *J Food Prot.* 67: 1153-1156.

Rasmussen T. B and Givskov M. 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *IJMM.* 296: 149-161.

Ravishankar S, Libin Z, Law B, Joens L, and Mendel F. 2008. Plant derived compounds Inactivate Antibiotic-Resistant *Campylobacter jejuni* strains. *J Food Prot.* 6:1145-1149.

Raybaudi R. M., Mosqueda J., and Martín O. 2006. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. *J Food Prot.* 69: 1579-1586.

Reisner A., Krogfelt K. A., Klein B. M., Zechner E. L., and Molin S. 2006. In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Strains: Impact of Environmental and Genetic Factors. *J Bacteriol.* 3572-3581.

Ren D., Sims J.J., and Wood T. K. 2001. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-Bromo-5-(Bromomethylene)-3-Butyl-2(5H)-Furanone. *Environ Microbiol.* 3:731-736.

Ren D., Sims J.J., and Wood T. K. 2002. . Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis*. by (5Z)-4-Bromo-5-(Bromomethylene)-3-Butyl-2(5H)-Furanone. Lett Appl Microbiol. 34: 293-299.

Ren D., Zuo R., González B. A. F., Bedzyk L. A., Eldridge G. R., Pasmore M. E., and Wood T. K. 2005. Differential Gene Expression for Investigation of *Escherichia coli* Biofilm Inhibition by Plant Extract Ursolic Acid. Appl Environ Microbiol. 4022-4034.

Rice S. A., Koh K. S., Queck S. Y., Labbate M., Lam K. W., and Kjelleberg S. 2005. Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues. J Bacteriol. 3477-3485.

Rietveld A. and Wiseman S. 2003. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. J Nutr. 133:3285-3292.

Ryu J-H. and Beuchat L. R. 2004. Factors affecting production of extracellular carbohydrate complexes by *Escherichia coli* O157:H7. I J Food Microbiol. 95, 189-204.

Ryu J-H. and 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. Appl Environ Microbiol. 247-254.

Saginur R., St Denis M., Ferris W., Aaron S., Chan F., Lee C. 2006. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. Antimicrob Agents Chemother. 50: 55-61.

Sandberg M., Määttä A., Peltron J., Vuorela P. M., Fallarero A. 2008. Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. I J Antimic Ag. 32: 233-240.

Santesteban-López A., Palou E., and López-Malo A. 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a_w and pH. Appl Microbiol. 102: 486-497.

Schauder S. and Bassier B. L. 2001. The Languages of bacterial. Genes & Development. 15: 1468-1480.

Sears C. L. and Kaper J. B. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev.* 60: 167-215.

Sharma R. and Demirci A. 2003. Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds and sprouts with electrolyzed oxidizing water. *Int J Food Microbiol.* 86: 231-237.

Shimkets L. J. 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria. *J Microbiol. Rev.* 54: 473-501.

Simpson B.B, Ogorzal M.C. 2001. Economic botany. In: Plants and their manipulation by people. McGraw Hill (ed.). USA. Pp. 1-2

Smith J. L. and Fratamico P. M. 2005. Diarrhea-inducing *Escherichia coli*. In: Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology, P. M. Fratamico, A. K. Bhunia, and J. L. Smith (ed.). Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom. Pp. 357-382.

Sofos J. N., Beuchat L. R., Davidson P. M., and Johnson E. A. 1998. Naturally occurring antimicrobials in food. Task force report no. 132. Council of Agricultural Science and Technology. Ames, Ioea.

Sommer P., Martin-Rouas C., and Mettler E. 1999. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiol.* 16: 503-515.

Sotomayor J. A., Martínez R. M., García A. J., and Jordán M. J. 2004. *Thymus zygis* subs. *Gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *J Agric Food Chem.* 52: 5418-5424.

Stahl S. J., Stewart K. R., and Williams F. D. 1983. Extracellular slime associated with *Proteus mirabilis* during swarming. *J Bacteriol.* 154: 930-937.

Stapper P. A., Narasimhan G., Ohman D. E., Barakat J., Hentzer M., Molin S., Kharazmi A., Hoiby N. and Mathee K. 2004. Alginate production affects

Pseudomonas aeruginosa biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol.* 53, 679-690.

Stoodley P., Sauer K., and Costerton J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 56:187-209.

Sulakvelidze A., Alavidze Z., and Morris J. G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Ag Chemother.* 45: 649-659.

Sulakvelidze A., and Barrow P. 2005. Phage therapy in animals and agribusiness. In *bacteriophages: biology and application*, R. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. Pp 335-380.

Teplitski M., Robinson J. B., and Bauer W. D. 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and effect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 637-648.

Tesh V. L., Ramegowda B., and Samuel J. E. 1994. Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infect Immun.* 62: 5085-5094.

Tomotake H., Koga T., Yamato M., Kassu A., and Ota F. 2005. Antibacterial activity of citrus fruit juices against *Vibrio* species. *J Nutr Sci.* 52: 157-160.

Troy F. A. 1979. The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers. *Annu Rev Microbiol.* 33: 519-560.

Tsai T-H., Chien Y-C., Lee C-W, and Tsai P-J. 2008. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: a comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chem.* 110: 859-864.

Uhlich G.A., Sinclair J. R., Warren N. G., Chmielecki W. A., and Fratamico P. 2008. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Two Multistate Food-Borne Outbreaks That Occurred in 2006. *Appl Environ Microbiol.* 1268-1272.

USDA (United States Department of Agriculture). Food Safety and Inspection Service. 2005. Foodborne Illnesses Continue Downward Trend: 2010 Health Goals for *E. coli* O157 Reached. [Internet]. Disponible en el sitio de red: http://www.fsis.usda.gov/News_&_Events/NR_041405_02/index.asp [Revisado el 27 de enero de 2010].

U. S. Food and Drug Administration. 1996. Title 21- Food and drugs, Chap. I-Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Part 179- Irradiation in the production, processing and handling of food. [Online]. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF179.html> [Revisado el 17 de septiembre de 2009].

Valtierra D. R. 2008. Mezclas de extractos de plantas para control de *Campylobacter jejuni/coli* y *Salmonella* spp. *in vitro* y en un modelo alimenticio. Tesis (Maestría). Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Vattem D. A., Mihali K. K., Crixell S. H., and Mclean R. J. 2007. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *J Fitoterapia*. 78: 302-310.

Vial P. A., Browne R. Robins, Lior H., Prado V., Kaper J. B., Nataro J. P., Maneval D., Elsayed A., and Levine M. M. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis*. 158: 70-79.

Vijay K. Juneja and Friedman Mendel. 2008. Carvacrol and Cinnamaldehyde facilitate thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *J Food Prot*. 71: 1604-1611.

Wang W-B., Lai H-C., Hsueh P-R., Chiou R. Y-Y., Lin S-B., and Liaw S-J. 2006. Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *J Med Microbiol*. 55: 1313-1321.

Welch R. A., Burland V., Plunkett G., Redford P., Roesch P., Rasko D., Buckles E. L., Liou S. R., Boutin A., Hackett J., Stroud D., Mayhew G. F., Rose D.J., Zhou S., Schwartz D. C., Perna N. T., Mobley H. L., Donnenberg M. S., Blattner F. R.. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 17020-17024.

White R. L., Burgess D.S, Manduru M, Bosso J. A. 1996. Comparison of three different in vitro methods of detecting Synergy: time kill, checkerboard, and E test. *Antimic Ag Chemother.* 40(8): 1914-1918.

Whittam T. S., Wolfe M. L., Wachsmuth I. K., Orskov F., and Wilson R. A. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun.* 61: 1619-1629.

Williams F. D. and Schwarzhoff R. H. 1978. Nature of the swarming phenomenon in *Proteus*. *Ann Rev Microbiol.* 32: 101-122.

Willians A. G., and Wimpenny J. W. T. 1977. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NC1B11264 grown in batch culture. *J Gen Microbiol.* 102: 13-21.

Wilson, C. L., Solar J. M., El Ghaouth, A., Wisniewski M. E. 1997. Rapid evaluation of plants extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81: 204-210.

Wirtanen G., Aalto M., Harkonen P., Gilbert P., and Mattila Sandholm T. 2001. Efficacy testing of commercial disinfectants against food borne pathogenic and spoilage microbes in biofilm construct. *Eur Food Res Technol.* 213: 409-414.

Yoon Y. and Sofos J. N. 2008. Autoinducer-2 activity of gram-negative foodborne pathogenic bacteria and its influence on biofilm formation. *J Food Sci.* 73(3):M140-147.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Aziel Deniz Escobar Rodríguez

Candidata para el Grado de:

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: EXTRACTOS DE PLANTAS COMO INHIBIDORES DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE *Escherichia coli* O157:H7

Campo de estudio: Productos naturales e inocuidad alimentaria.

Datos Personales: Nacida en Monterrey, N.L. el 14 de enero de 1987, hija de Mayra E. Rodríguez Flores y Baldemar Escobar González.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2008.

Experiencia Profesional: Practicante del laboratorio Magistral de Farmacias Benavides en el 2007. Practicante de tiempo completo en la empresa Qumiproducos en el 2008.