

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INFLUENCIA DE PRODUCTOS NATURALES Y TEMPERATURA SOBRE LOS  
PROCESOS FISIOLÓGICOS ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA EN *Escherichia*  
*coli* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA

Por

MC. CINDY JOANNA CABALLERO PRADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
especialidad en Microbiología

2020

INFLUENCIA DE PRODUCTOS NATURALES Y TEMPERATURA SOBRE LOS  
PROCESOS FISIOLÓGICOS ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA EN *Escherichia*  
*coli* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA

Comité de Tesis



---

Dr. José Santos García Alvarado  
**DIRECTOR**



---

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto  
**Secretario**



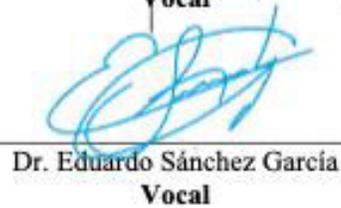
---

Dra. Norma Laura Heredia Rojas  
**Vocal**



---

Dr. José Ángel Merino Mascorro  
**Vocal**



---

Dr. Eduardo Sánchez García  
**Vocal**

INFLUENCIA DE PRODUCTOS NATURALES Y TEMPERATURA SOBRE LOS  
PROCESOS FISIOLÓGICOS ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA EN *Escherichia*  
*coli* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA

Director de Tesis



---

Dr. José Santos García Alvarado

Codirector de Tesis



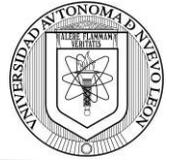
---

Dra. Norma Laura Heredia Rojas



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

FCB-SP-0636/2020

**CINDY JOANA CABALLERO PRADO**

Alumna del Doctorado en Ciencias con Especialidad  
en Microbiología  
Presente. -

En sesión del Comité Doctoral celebrada el día 07 de Septiembre del 2020, fue **APROBADA** la tesis titulada: **INFLUENCIA DE PRODUCTOS NATURALES Y TEMPERATURA SOBRE LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA EN Escherichia coli PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA**. Así mismo le informo que puede seguir con los trámites académicos correspondientes para su titulación.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

*“Alere Flammam Veritatis”*

Ciudad Universitaria, 08 de Septiembre de 2020.

**DRA. KATIUSHKA ARÉVALO NIÑO**  
Subdirectora de Posgrado

c.c.p. Dr. José Santos García Alvarado - Director de tesis  
c.c.p. archivo  
\*Mónica



Ciudad Universitaria, C.P. 66451, A.P. 46 "F" San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.  
Tel. (81) 83294000 Ext 3651  
katiushka.arevalonn@uanl.edu.mx

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la codirección de la Dra. Norma Heredia Rojas. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Proyecto 285151).

## **AGRADECIMIENTOS**

A mí Dios, que me cuida siempre y sigue mis pasos día con día, por darme la fortaleza de culminar un escalón más de mi vida profesional y personal, a él le agradezco primeramente por permitirme vivir, darme salud, sabiduría, paciencia y fe para todos los retos que se me han presentado y seguirán presentándose.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y el Dr. José Santos García Alvarado, por permitirme prepararme profesionalmente en el LABGEM, recibirme como su estudiante tanto en mi maestría como doctorado.

Al Dr. José Ángel Merino Mascorro por apoyarme, ser mi guía en parte del diseño experimental y acompañarme en la culminación de mi posgrado.

Quiero agradecer al Dr. Juan Manuel Ballesteros Torres, por su contribución con el análisis estadístico de este estudio.

## DEDICATORIA

A mis amados padres Elías Caballero Ayala y María Yolanda Prado Andrade, por darme la dicha de existir, por darme su amor, por cuidarme y enseñarme valores que a lo largo de mi existencia siempre antepondré, por prepararme como una mujer valiente, fuerte, independiente, sensible y con mucho amor por entregar a mis hermanos y seres queridos. Los amo hasta el último día, toda la vida no me cansaré de agradecer todo lo que soy es gracias a su esfuerzo, su trabajo, sus enseñanzas, son las personas más importantes para mí, y este escrito también es gracias a su motivación a creer siempre en mí a verme y decirme que soy capaz de lo que yo me proponga, gracias papi y mami son mi mayor tesoro.

A mis hermanos Ulises, Alexander, Paola, Kimberly y Brean todos Caballero Prado, mis primeros y más grandes amigos, ustedes siempre están para mí y yo siempre estaré para ustedes, los amo hermanos gracias, esta culminación, mis éxitos son con y junto a ustedes.

A mis ángeles en la tierra, mis sobrinos. Aún no tengo la dicha de tener una criaturita tan hermosa como ustedes, son lo más cercano a lo que he sentido el amor por un hijo. Mis amores Alexander, Edwin, Ingrid, Patricio, Elías, Matías, José María y Diego, son mi adoración siempre buscaré su bienestar, los guiare y acompañare en su vida.

A el amor y hombre de mi vida, mí novio Luis Fernando Ortiz Navarro. Gracias, mi amor por ser mi amigo y el mayor de mis críticos, solo tu sabes y comprendes lo que me ha costado llegar hasta aquí, todos mis logros son tuyos también.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES.....	4
Patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	4
<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga STEC .....	4
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica EHEC O157: H7 .....	5
Factores de virulencia.....	6
a) Formación de biopelícula .....	6
b) Fimbrias tipo 1.....	10
c) Pili conjugativo.....	11
d) Motilidad de las bacterias impulsada por flagelos .....	12
e) Movilidad tipo swarming (movimiento coordinado) .....	14
Productos naturales .....	18
Citral .....	18
Eugenol .....	19
Hexanal .....	20
Actividad de proteínas del choque térmico bacteriano .....	20
JUSTIFICACIÓN .....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
Productos naturales .....	28
Cepas Bacterianas .....	28
Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	29
Choque térmico y determinación de concentraciones subinhibitorias .....	29
Efecto de los agentes antimicrobianos y choque térmico en la motilidad swarming.....	30
Ensayo <i>in vitro</i> para la formación de biopelícula en microplacas de poliestireno .....	30
Extracción de RNA para Biopelícula.....	32
Obtención de las células en swarming para extracción de RNA.....	32
Extracción de RNA, síntesis de cDNA y cuantificación RT-PCR.....	33
RESULTADOS.....	35
Efecto de los productos naturales sobre el crecimiento bacteriano.....	35

Efecto de los productos naturales, choque térmico y su combinación sobre los factores de virulencia de las STEC.....	36
a) Formación de biopelícula.....	36
b) Movilidad Swarming.....	43
Expresión de genes relacionados con la virulencia STEC O26 .....	49
a) Formación de biopelícula.....	49
b) Movilidad Swarming.....	56
DISCUSION .....	62
CONCLUSIONES .....	66
PERSPECTIVAS .....	67
BIBLIOGRAFÍA .....	68
RESUMEN BIOGRÁFICO .....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación semicuantitativa de la formación de biopelícula.(Teh et. al., 2010) .....	31
Tabla 2. Genes y oligonucleótidos utilizados para expresión génica en STEC. ....	34
Tabla 3. Concentraciones mínimas bactericidas (CMB mg/mL) de compuestos naturales para el crecimiento de cinco serotipos de <i>E. coli</i> . ....	36
Tabla 4. Efecto de la combinación de los productos naturales y el choque térmico sobre la formación de biopelícula. Las concentraciones de citral, eugenol y hexanal fueron de 0.1%, 0.25% y 0.5% respectivamente. ....	39
Tabla 5. Determinación del uso de productos naturales y choque térmico sobre la formación de biopelícula en las cepas de <i>E. coli</i> . Las concentraciones de citral, eugenol y hexanal fueron de 0.1%, 0.25% y 0.5% respectivamente. ....	42
Tabla 6. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en cinco serotipos de <i>E. coli</i> STEC sobre el movimiento tipo swarming. ....	45
Tabla 7. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en cinco serotipos de <i>E. coli</i> STEC sobre el movimiento tipo swarming. ....	48
Tabla 8. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en la expresión de genes relacionados a biopelícula en STEC O26. ....	52
Tabla 9. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en la expresión de genes relacionados a biopelícula en STEC O26. ....	55
Tabla 10. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en la expresión de genes relacionados a swarming en STEC O26. ....	58
Tabla 11. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en la expresión de genes relacionados a swarming en STEC O26. ....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Formación y dispersión de biopelículas. ....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 2. Componentes de flagelo bacteriano. ....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 3. Genes de ensamble flagelar en E. coli. ....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 4. Inducción traslacional por choque térmico. ....</i>	<i>21</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

≥	Mayor o igual que	HS	Choque térmico
±	Más menos	HSG	Genes de choque térmico
%	Porcentaje	HSP	Proteínas del choque térmico
<	Menor que	HSR	Respuesta al choque térmico
A	Absorbancia	IFB	Índice de formación de biopelícula
AB	Bacterias teñidas y adheridas	LB	Luria Bertani
ACP	Agar cuenta en placa	MDR	Multidroga resistente
AE	Aceites esenciales	mg	Miligramos
AI	Autoinductor	MGE	Elementos genéticos móviles
ANOVA	Análisis de varianza	MH	Mueller Hinton
RNA	Ácido ribonucleico	min	Minutos
ATCC	American Type Culture Collection	mL	Mililitros
FB	Formación de biopelícula	NaCl	Cloruro de Sodio
BHI	Infusión cerebro corazón	nm	Nanómetros
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia	NPEC	<i>Escherichia coli</i> no patógena
CH	Colitis hemorrágica	°C	Grados Celsius
CMB	Concentración mínima bactericida	PBS	Solución tamponada de fosfatos
CV	Cristal violeta	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CW	Control teñido	PG	Peptidoglicano
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa	pH	Potencial de Hidrógeno
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarréica	QS	Quorum sensing
DNA	Ácido desoxirribonucleico	rpm	Revoluciones por minuto
DO	Densidad óptica	RT	Tiempo real del inglés real time
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	SPE	Sustancias poliméricas extracelulares
EC	<i>Escherichia coli</i>	SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	Stx	Toxina Shiga
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	SUH	Síndrome urémico hemolítico
FAO	Food and Agriculture Organization	UFC	Unidades formadoras de colonias
FDA	Food and Drug Administration	WHO	World Health Organization
G	Crecimiento de células	xg	Gravedades
GRAS	Generally recognized as safe	μL	Microlitros
h	Hora		

## RESUMEN

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) son patógenas para los humanos y son capaces de causar enfermedades de leves a graves. En este estudio, se evaluó el efecto antimicrobiano de citral, eugenol y hexanal en combinación con choque térmico (HS) en el crecimiento, formación de biopelículas, swarming y expresión de genes de virulencia de los serotipos STEC (O157: H7, O103, O111 y O26). Las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) se evaluaron mediante el método de recuento en placa. Se aplicaron concentraciones subletales de los compuestos además del choque térmico (46°C / 1 h y 55°C/1 h). La formación de biopelículas se midió mediante un ensayo colorimétrico utilizando cristal violeta, se determinó la movilidad “swarming” en placas de agar LB semisólido y la expresión génica mediante la cuantificación de RT-PCR. El eugenol fue el compuesto más efectivo sobre el crecimiento de cepas de *E. coli* (CMB =0.58 mg/mL a 0.73 mg/mL), seguido de citral (CMB =0.86 mg/mL a 1.26 mg / mL) y hexanal (CMB =2.24 mg/mL a 2.52 mg/mL). La exposición a productos naturales solos o en combinación con HS no provocó efectos generalizados, y estos varían según el tratamiento específico; la mayoría de los tratamientos aplicados a las cepas STEC O103, O111 y O157: H7 inhibieron la formación de biopelículas; aunque la cepa O26 formó una biopelícula fuerte por efecto del choque térmico, sin embargo, después de la exposición a los compuestos, cambió a no formadora de biopelícula. En esta cepa, los genes relacionados con la biopelícula *csgA* y *csgD* se sobreexpresaron 5,5 veces por choque térmico, pero la sobreexpresión disminuyó cuando también se expusieron a compuestos naturales. No se observó un patrón consistente en la motilidad swarming por efecto de compuestos naturales solos o en combinación con HS. Todos los genes analizados para swarming se sobreexpresaron por efecto del choque térmico y por eugenol. El resto de los productos naturales solos o en combinación con HS no mostraron una tendencia regular. La expresión del gen de la Shiga (*stxI*) en las biopelículas y en swarming por efecto de la exposición a productos naturales solos o en combinación con HS varía considerablemente, lo que tiende a aumentar la expresión en las células de biopelícula y aumenta la proliferación de bacterias. Este estudio indicó que las combinaciones de compuestos naturales y HS afectaron el crecimiento, la biopelícula, la motilidad swarming y la expresión de genes involucrados en la virulencia, y que estos procesos tienen una gran variabilidad entre cepas y no pueden relacionarse con un compuesto específico o con HS.

## ABSTRACT

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains are pathogenic for humans and capable of causing mild to severe illnesses. In this study, the antimicrobial effect of citral, eugenol and hexanal in combination with heat shock (HS) was evaluated on growth, biofilm formation, swarming and expression selected virulence genes of STEC serotypes (O157: H7, O103, O111 and O26). The minimum bactericidal concentrations (MBC) were evaluated by the plate count method. Sublethal concentrations of compounds and heat shock (46°C/1 h and 55°C/1h) were applied. Biofilm formation was measured by violet crystal assay, swarming mobility was determined on semi-solid LB agar plates, and gene expression by qPCR. Eugenol was the most effective compound against growth of *E. coli* strains (MBC=0.58 to 0.73 mg/mL), followed by citral (MBC=0.86 to 1.26 mg/mL) and hexanal (MBC=2.24 to 2.52 mg/mL). The exposure to natural products alone or in combination with HS did not provoke standardized effects, and these vary depending on the specific treatment; most of the treatments applied to strains O103, O111, and O157: H7 inhibited biofilm formation; although strain O26 formed strong biofilm by the effect of heat shock after exposition to compounds, changed to non-biofilm; in this strain, the related to biofilm genes *csgA* and *csgD* were overexpressed 5.5 fold by heat shock, but overexpression was decreased when also were exposed to natural compounds. No consistent pattern was observed in swarming motility by the effect of natural compounds alone or in combination with HS. All the genes analyzed during swarming were overexpressed by the effect of heat shock and by eugenol. The rest of natural products alone or in combination with HS did not showed a regular tendency. Shiga toxin gene expression on biofilm and swarmer cells by the effect of exposition to natural products alone or in combination with HS vary considerably, tending to up expression in biofilm cells, and increasing in swarming bacteria. This study indicates that combinations of natural compounds and HS affects growth, biofilm, swarm motility, and the expression of genes involved in virulence, and have great variability between strains and cannot be related to specific compound or to HS.

## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es un miembro importante del microbiota intestinal humana que brinda una función reguladora y un beneficio mutuo con el humano (Eigner *et. al.*, 2017). Las cepas de *E. coli* se han agrupado en al menos seis patotipos con base en evidencia epidemiológica, rasgos fenotípicos, características clínicas y factores de virulencia específicos. Uno de ellos es la *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), responsable de procesos patológicos como la colitis hemorrágica (CH) y complicaciones graves como el síndrome urémico hemolítico (SUH) (Page y Liles 2013). El serotipo O157: H7 pertenece a este grupo y es el que causa enfermedades reportado con más frecuencia (Rangel *et. al.*, 2005; Carter *et. al.*, 2016), sin embargo, otros serotipos llamados O26, O45, O103, O111, O121 y O145 conocidos como "big six" también son muy frecuentes y responsables del 70% de los 1579 episodios de enfermedad, 202 hospitalizaciones y 4.7 muertes de enfermedades transmitidas por alimentos relacionadas con STEC no O157 en los Estados Unidos cada año (Almanza, 2011; Brooks *et. al.*, 2005; Simpson *et. al.*, 2012; Fouladkhah *et. al.*, 2013). Sin embargo, todas las cepas STEC están ganando importancia a nivel mundial debido al aumento de los problemas relacionados con ellas (Hedican *et. al.*, 2009; Mathusa *et. al.*, 2010; Sheng *et. al.*, 2016).

Aunque las toxinas Shiga (stx; stx1 y/o stx2) son parte de los factores de virulencia importantes de estas bacterias, otros procesos como la motilidad swarming y la formación de biopelículas también contribuyen a desarrollar o aumentar su persistencia en los ambientes. La motilidad swarming permite que las bacterias migren cooperativamente sobre superficies semisólidas y sólidas y aumenta la resistencia a los antimicrobianos (Partridge *et. al.*, 2019). Las biopelículas son comunidades microbianas sésiles en superficies formadas a través de la secreción de sustancias poliméricas extracelulares, estos compuestos mejoran la adherencia a las superficies e inducen la agregación microbiana (Donlan y Costerton, 2002; Chen *et. al.*, 2015). El flagelo es principalmente un orgánulo de motilidad que permite el movimiento y la quimiotaxis. Por otro lado, las bacterias pueden tener uno o varios flagelos, y pueden ser polares (uno o varios flagelos en un punto) o peritrico (varios flagelos en toda la bacteria). Además de la motilidad, los

flagelos poseen varias otras funciones que difieren entre las bacterias y durante el ciclo de vida bacteriano: un flagelo puede, por ejemplo, participar en la formación de biopelículas, la exportación de proteínas y la adhesión (Haiko y Westerlund-Wikström, 2013).

En los humanos, la patogénesis de las cepas STEC implica la adhesión de bacterias al epitelio del íleon seguido de colonización del colon y producción de las toxinas stx, lo que altera la función de barrera epitelial y el transporte de iones, causando diarrea. La stx puede llegar al torrente sanguíneo y diseminarse a tejidos extraintestinales, produciendo enfermedades más graves y secuelas importantes como el SUH que pueden provocar la muerte (Montero *et. al.*, 2017).

El aumento de la resistencia a los antibióticos por parte de los patógenos microbianos está acelerando la búsqueda de estrategias alternativas y agentes novedosos para controlar su presencia en alimentos e infecciones bacterianas. Desde hace décadas se ha prestado atención a los fitoquímicos de plantas como antimicrobianos. Existe evidencia científica que estos compuestos son menos propensos a inducir resistencia bacteriana y muchos de ellos se clasifican como generalmente seguros para el consumo humano (Kim *et. al.*, 2016).

El citral, eugenol y hexanal son compuestos atractivos para ser analizados para la inhibición de *E. coli* productora de toxina Shiga. El citral es un componente activo principal de los aceites cítricos y se agrega comúnmente a los alimentos y bebidas (p. ej., refrescos y postres), y está aprobado para su uso en los alimentos por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, con Código de Regulaciones Federales (CFR): GRAS, 21 CFR 182 · 60) Además, el citral ha mostrado actividad antibacteriana contra *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. El eugenol se usa como agente saborizante en los alimentos y ha demostrado propiedades antimicrobianas, causando la inhibición contra hongos, virus y bacterias. El hexanal posee una actividad notable contra varios hongos, bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo un buen candidato para ser explorado por su actividad contra las cepas STEC (Patrignani *et. al.*, 2008; Devi *et. al.*, 2010; Shi, *et. al.*, 2017; Mak *et. al.*, 2019).

Uno de los mecanismos que las bacterias han desarrollado para sobrevivir en condiciones desfavorables es la capacidad de responder a situaciones de estrés. Esta respuesta al estrés está mediada por un patrón cambiado de expresión génica que

generalmente resulta en una mayor tolerancia de las bacterias al factor de estrés que desencadenó la respuesta y, por lo general, también a una serie de otros factores de estrés (Pichereau *et. al.*, 2000). Durante las últimas décadas, las respuestas a diferentes tipos de estrés se han estudiado intensamente en varias bacterias, y la regulación genética y la interacción entre diferentes regulones de estrés se entiende bien en organismos modelo como *E. coli* (Hengge, 2002; Foster *et. al.*, 2000).

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto individual de citral, eugenol y hexanal sobre varios serotipos de STEC, en particular sobre el crecimiento, la formación de biopelículas y el movimiento swarming. Además, determinamos el efecto de estos compuestos combinado con tratamientos térmicos sobre la viabilidad, los factores de virulencia y la expresión de genes asociados a la virulencia en las cepas STEC.

## ANTECEDENTES

### **Patotipos de *Escherichia coli***

Las cepas de *E. coli* aisladas de enfermedades intestinales se han agrupado en al menos seis patotipos principales en función de la evidencia epidemiológica, rasgos fenotípicos, características clínicas y factores de virulencia específicos. Los patotipos intestinales bien descritos incluidos todos en las *E. coli* diarreogénica (DEC) son: *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), y *E. coli* adherentemente difusa (DAEC). Los genes asociados a la virulencia que son exclusivos de un patotipo se han utilizado como marcadores moleculares para definir el patotipo de las cepas de *E. coli* (Xiangning *et. al.*, 2019).

### ***E. coli* productora de toxina Shiga STEC**

La STEC, definida por la producción de toxinas Shiga (stxs) codificadas por fagos, plantea un importante problema de salud pública, ya que puede causar un amplio espectro de síntomas que van desde el proceso asintomático hasta la diarrea severa, así como la diarrea sanguinolenta y el síndrome urémico hemolítico (SUH). Las toxinas stx se clasifican en dos familias principales, Stx1 y Stx2 (codificadas por *stx1* y *stx2*) sobre la base de ensayos de neutralización de toxinas y análisis de secuencia. Las Stx1 se clasificaron en tres subtipos Stx1 (Stx1a, Stx1c y Stx1d) y las Stx2 en siete subtipos (Stx2a a 2g) basadas en similitudes de secuencias y análisis filogenético (Scheutz *et. al.*, 2012).

La capacidad de producir toxinas Shiga (stx) es la principal característica de virulencia de la *E. coli* (STEC). Estas potentes citotoxinas bloquean la síntesis de proteínas al inactivar los ribosomas, su acción sobre las células blanco es responsable de las formas más graves de enfermedades inducidas por STEC, como la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (SUH) potencialmente mortal. Muchos marcadores de virulencia para un patotipo a menudo se transportan en elementos genéticos móviles (MGE) como fagos y plásmidos como se menciona en STEC y ETEC, lo que permite la

adquisición de genes de virulencia a través de MGE y la transferencia horizontal de genes que conducen a la aparición de patotipos híbridos (Tozzoli *et. al.*, 2014).

Además de las toxinas stx, las cepas STEC pueden poseer rasgos de virulencia adicionales, como factores de adhesión, sistemas de secreción de proteínas o toxinas adicionales, parcialmente codificadas en elementos genéticos móviles, como plásmidos o islas de patogenicidad. La gran flexibilidad genómica resultante de esta patovariedad se refleja en el hecho de que se sabe que las cepas de más de 400 serotipos de *E. coli* diferentes codifican Stx. Sin embargo, muy pocos de estos, incluidos los que poseen antígenos O O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157, son responsables de la mayoría de las infecciones humanas (Brooks *et. al.*, 2005).

El ganado bovino es un reservorio natural de STEC; una de las vías de transmisión de este patógeno es el consumo de alimentos contaminados, como la carne mal cocida. La dosis infectiva para el humano es muy baja es inferior a 100 organismos y tan poco como 10, lo que redundaría en altas tasas de infección y transmisión a las personas (Etcheverría y Padola, 2013).

### ***Escherichia coli* enterohemorrágica EHEC O157: H7**

*E. coli* O157: H7 es uno de los patógenos transmitidos por los alimentos más importantes del mundo, que causa gastroenteritis, síndrome urémico hemolítico (SUH), colitis hemorrágica y púrpura trombocitopénica trombótica en grupos susceptibles, como niños y personas mayores. Generalmente está altamente asociado con el ganado, y los productos frescos contaminados han sido recientemente implicados en enfermedades transmitidas por los alimentos por *E. coli* O157:H7. Además, dichos brotes transmitidos por los alimentos también pueden ocurrir después del consumo de alimentos contaminados de forma cruzada con patógenos que residen en entornos asociados con los alimentos, incluidos los procesos de producción, transporte y cocción (Lim *et. al.*, 2019).

Las células bacterianas se adhieren a las superficies abióticas y producen estructuras similares a películas que protegen a las células de las tensiones ambientales, como la desinfección en un entorno de procesamiento de alimentos. Esta estructura, llamada biopelícula, puede generar serios problemas durante la producción, distribución y consumo de alimentos por contaminación cruzada. Estudios anteriores mostraron que

las biopelículas de *E. coli* O157:H7 que se forman en superficies en contacto con alimentos como el acero inoxidable eran resistentes al ambiente de secado y a la desinfección (Adator *et. al.*, 2018).

## **Factores de virulencia**

### **a) Formación de biopelícula**

Las infecciones causadas por *E. coli* son difíciles de erradicar debido a la formación de "biopelículas" (Danese *et. al.*, 2000). Una biopelícula se define como un agregado de microorganismos que viven juntos como comunidad y a menudo se encuentran unidos a superficies sólidas en ambientes húmedos. Los microorganismos en una biopelícula secretan una variedad de sustancias protectoras llamadas EPS (exopolisacáridos) que mejoran su eficiencia de supervivencia. Las biopelículas de *E. coli* son el principal agente causante de muchas infecciones intestinales. Las densas células bacterianas en la biopelícula se comunican entre sí a través de la vía de señalización química conocida como quórum sensing (QS). Durante el QS, las células bacterianas secretan sustancias autoinductoras (AI) al medio extracelular y una vez que se alcanza la alta densidad requerida, aumentan la formación y maduración de biopelículas (Sturbelle *et. al.*, 2015). Las AI ayudan a las células bacterianas de la biopelícula a secretar factores de virulencia, a modular la respuesta inmune del huésped y a generar cambios genéticos. En las cepas enterohemorrágicas de *E. coli* el sistema de QS regula la expresión de más de 400 genes. Entre estos se encuentran los genes que codifican para el sistema de secreción tipo III, motilidad flagelar, adhesión a superficies y producción de la toxina Shiga (March y Eiros, 2013). La biopelícula dificulta la penetración de los antibióticos convencionales y hace que las células sean menos susceptibles a los antibióticos (Ito *et. al.*, 2009; Mittal *et. al.*, 2015).

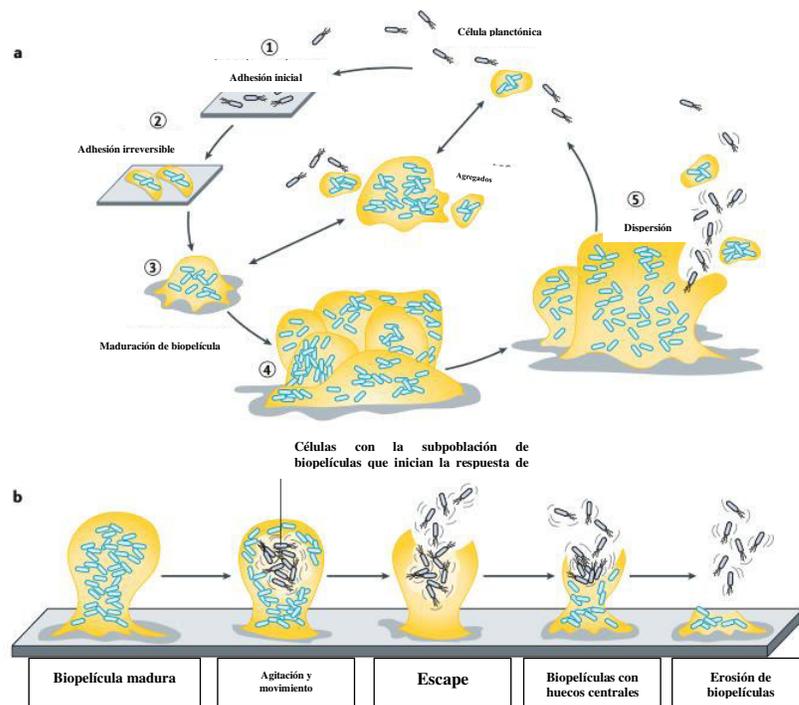
En las biopelículas, las células bacterianas producen sustancias poliméricas extracelulares (SPE) con DNA extracelular, proteínas y polisacáridos, forman una película viscosa que rodea las células bacterianas. Además, las SPE está involucrado en la unión de las células a las superficies y en la formación de estructuras tridimensionales de

biopelículas y sirve como una barrera protectora para los desinfectantes comerciales (Fouladkhah *et. al.*, 2013).

Aunque la toxina Shiga es el factor de virulencia definitivo para STEC (WHO/FAO 2018), la capacidad de formar biopelículas también puede aumentar o promover la persistencia y resistencia de estos patógenos en las superficies de los alimentos y en el medio ambiente, aumentando el riesgo de exposición humana. Actualmente, las biopelículas son de considerable interés para la inocuidad de alimentos y las comunidades médicas debido a su resistencia a los desinfectantes y a otros antimicrobianos (Gutiérrez *et. al.*, 2016; Otter *et. al.*, 2015). Esta característica es conferida por la matriz de la sustancia polimérica extracelular (Sharma *et. al.*, 2019; Wang *et. al.*, 2018), el estado metabólico de las células dentro de la biopelícula (Singh *et. al.*, 2017), así como los cambios en la expresión génica debido a la respuesta al estrés y a los sistemas de señalización de detección de quórum, que regulan la síntesis de enzimas degradantes en las células de biopelícula (Del Pozo y Patel 2007). Factores como la temperatura (Wang *et. al.*, 2012), tiempo de exposición (Culler *et. al.*, 2014), diferentes apéndices extracelulares (Beloin *et. al.*, 2008), la formación de sustancias poliméricas extracelulares (Sharma *et. al.*, 2016), disponibilidad de nutrientes (Klausen *et. al.*, 2003), la diferencia en el tipo de superficie colonizada y la variabilidad en las características de las cepas bacterianas individuales (Biscola *et. al.*, 2011) desempeñan un papel crítico en la colonización de superficies por *E. coli*.

Las bacterias exhiben dos modos de crecimiento: el modo planctónico de vida libre o el modo sésil, adherido a la superficie dentro de las biopelículas, que son comunidades estructuradas encerradas en una matriz polimérica de producción propia. La capacidad de formar una biopelícula no es solo un rasgo común de varios microorganismos, incluidos los eucariotas unicelulares como las levaduras, sino que también se ha reconocido como el modo dominante de crecimiento bacteriano en la naturaleza (Rumbaugh y Sauer, 2020). La formación de biopelícula es un proceso de desarrollo que se inicia por organismos planctónicos (de vida libre) que forman agregados y/o la transición a un estilo de vida asociada a la superficie, y se completa cuando las células escapan de la estructura de la biopelícula en un proceso referido como 'dispersión' para volver al estado planctónico de crecimiento. Aunque ahora se acepta ampliamente que la mayoría de las especies

bacterianas, si no todas, forman biopelículas en un proceso cíclico, la primera y más detallada información sobre el ciclo de vida del desarrollo de biopelícula proviene de la investigación con *Pseudomonas aeruginosa*. Este proceso de desarrollo se ha descrito como un proceso secuencial y altamente regulado, que involucra al menos cinco etapas fenotípicamente distintas (**Figura. 1**), con cada etapa de desarrollo de biopelícula correspondiente a patrones únicos de producción de proteínas y expresión génica (Petrova *et. al.*, 2017).



**Figura 1. Formación y dispersión de biopelículas (Rumbaugh y Sauer 2020).**

Las características clave relacionadas con el modo de crecimiento sésil incluyen la pérdida de la expresión génica del flagelo, la producción de componentes de la matriz de biopelículas, la inducción de mecanismos de resistencia a los antibióticos (incluidas las bombas de flujo de salida incluso cuando las biopelículas se cultivaron en ausencia de antibióticos) y el aumento de los niveles de determinantes de virulencia (Liao *et. al.*, 2013). Como consecuencia, las células de biopelícula muestran características y comportamientos que son distintos de los de sus contrapartes planctónicas, con las características distintivas que incluyen resistencia innata a las defensas inmunes del

huésped y su mayor tolerancia al estrés, incluidos la falta de nutrientes, la deshidratación y los agentes antimicrobianos. En particular, se ha informado que las biopelículas son de 10–1,000 veces más tolerantes a varios antibióticos en comparación con sus contrapartes planctónicas (Davies, 2003). Estas características provocan graves consecuencias en entornos médicos e industriales. Por ejemplo, las biopelículas se encuentran con frecuencia en superficies de ingeniería, donde causan incrustaciones biológicas (bioincrustaciones) (De Carvalho, 2018).

Se cree que el desprendimiento es el mecanismo principal que limita la acumulación general de biomasa de biopelícula y se refiere a la liberación pasiva de partículas de biopelícula debido a la tensión mecánica o de corte. Distintas bacterias de desprendimiento que se convierten en un modo de crecimiento planctónico que es más vulnerable a los agentes antimicrobianos y a las respuestas inmunes, la dispersión ahora se considera una vía prometedora para el control de biopelículas (Rumbaugh y Sauer, 2020).

En bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Salmonella*, la motilidad activa depende de un aparato flagelar que es necesario para que naden en medio líquido o semilíquido. En uno de los primeros estudios con *E. coli* como sistema modelo, se descubrió que la mitad de los mutantes de inserción deficientes en la formación de biopelículas identificados por Pratt y Kolter (1998) perturbaban las funciones flagelares. Estos autores demostraron que la motilidad misma, y no la quimiotaxis o el contacto directo de la superficie con los flagelos, era necesaria para formar una biopelícula, y propusieron que, más allá de permitir que las bacterias rompieran las fuerzas repulsivas, los flagelos también pueden permitir que las bacterias se propaguen a lo largo de la superficie. Las capacidades de formación de biopelículas se correlacionaron directamente con su capacidad para nadar (Beloin *et. al.*, 2008). Aunque esto sugiere que el requisito de generar orgánulos en la superficie celular es un tema común en la formación de biopelículas, no es un requisito absoluto, y las bacterias no móviles aún pueden formar biopelículas en ciertas condiciones, como se muestra para *E. coli* K-12 (Pratt y Kolter 1999), pero también para *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Sheikh *et. al.*, 2001). En una cepa no móvil que sobreexpresa las adhesinas superficiales conocidas como curli, se ha

demostrado que la motilidad flagelar no es necesaria para la adhesión inicial, ni para el desarrollo de biopelículas (Prigent- Combaret *et. al.*, 2000).

Junto con los aspectos termodinámicos, se ha demostrado ampliamente la contribución directa de los orgánulos adhesivos de la familia fimbrial a la unión irreversible de las bacterias a las superficies. Tres clases de fimbrias tienen un papel en el fortalecimiento de las interacciones de bacterias a la superficie: fimbrias tipo 1, curli y pili conjugativo (Beloin *et. al.*, 2008).

### **b) Fimbrias tipo 1**

Las fimbrias tipo 1 (o pili) son adhesinas protéicas filamentosas comúnmente expresadas tanto por aislamientos comensales como patógenos de *E. coli*. Las bacterias que expresan fimbrias tipo 1 generalmente presentan entre 100 y 500 fimbrias en su superficie. Estas fimbrias tienen una estructura tubular que tiene un diámetro de 5-7 nm y una longitud de entre 0.2 y 2  $\mu\text{m}$ . Los pili tipo 1 pueden adherirse, de manera dependiente de manosa, a una variedad de moléculas receptoras en las superficies de las células eucariotas (Duncan *et. al.*, 2005) y son factores de virulencia bien documentados en *E. coli* patógena (Kaper *et. al.*, 2004). Junto con su papel en la formación de biopelícula secretada mediada por IgA en el intestino, estas adhesinas son críticas para la formación de biopelículas de *E. coli* en superficies abióticas. La expresión de pili tipo 1 es inducida por la adhesión y la formación de biopelículas en etapas tempranas y tardías (Beloin *et. al.*, 2004).

### **Curli**

Identificadas inicialmente en *E. coli*, las fimbrias tipo curli, también llamadas fimbrias agregadas delgadas, son producidas por otras *Enterobacteriaceae* como *Shigella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*. Las fimbrias tipo curli se agregan en la superficie celular para formar estructuras de 6 a 12 nm de diámetro cuya longitud varía entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$ . Se ha demostrado que estas fimbrias se unen a las proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, la laminina y el plasminógeno, promoviendo así la adhesión de la bacteria a diferentes células humanas. Además, las fibras adhesivas curli también promueven la

formación de biopelículas en superficies abióticas, al facilitar las interacciones iniciales entre la superficie celular y las interacciones posteriores entre células (Uhlich *et. al.*, 2006). Los genes involucrados en la producción de curli se agrupan en dos operones transcritos de manera divergente: el operón *csgBA*, que codifica los componentes estructurales del curli, el operón *csgDEFG*, que codifica un regulador transcripcional (CsgD) y la maquinaria de exportación de curli (CsgE-G). En aislamientos ambientales y clínicos de *E. coli*, la síntesis de curli está sujeta a una regulación estricta y compleja que permite la producción de curli notablemente a 37 °C y/o 28 ° C dependiendo de los aislamientos, mientras que la expresión de curli es crítica en la mayoría de las cepas de *E. coli* de laboratorio. Junto con el sistema de dos componentes EnvZ/OmpR, varios reguladores transcripcionales (CpxR, RcsCDB, RpoS, H-NS, IHF, Crl, MlrA) responden a diferentes condiciones ambientales y de estrés como la temperatura, la osmolaridad, el pH y la oxigenación. Estos están involucrados en la regulación de la expresión de curli a través de una red de interacciones entre los factores de transcripción y la región reguladora de *csg*. Se supone que esta compleja red reguladora permite el ajuste fino de la expresión de curli que puede desempeñar un papel en la colonización de nichos específicos por *E. coli*, especialmente en el cuerpo humano (Prigent-Combaret *et. al.*, 20001).

### **c) Pili conjugativo**

Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* K-12 de laboratorio son pobres formadoras de biopelículas, la introducción, ya sea artificial o natural, en comunidades mixtas de *E. coli* de un plásmido conjugado en estas cepas, induce la formación de una biopelícula madura espesa (Reisner *et. al.*, 2006). El análisis mutacional de los genes del aparato de transferencia conjugativa del plásmido F demostró que este fenotipo no depende de la capacidad de los plásmidos para mediar la transferencia de ADN, pero sí requiere un pili conjugativo funcional (Ghigo 2001). El F-pili promueve la adhesión inicial y la maduración de la biopelícula a través de la unión inespecífica a las superficies abióticas y los posteriores contactos de célula a célula, que estabilizan la estructura de la biopelícula (Molin y Tolker-Nielsen 2003). Reisner *et. al.*, (2003) también demostraron que la expresión del pilis conjugativo F podría sustituir funcionalmente a otros factores de

adhesión conocidos como el pili tipo 1, Ag43 o curli. La producción de biopelículas mediadas por plásmidos no se limita a los plásmidos F, y la mayoría de los plásmidos conjugativos probados contribuyen directamente, tras la desrepresión de su función conjugativa, a la capacidad bacteriana del huésped para formar una biopelícula (Ghigo 2001). Esta conexión general entre la conjugación y la formación de biopelículas es consistente con las primeras observaciones que muestran que los contactos de la superficie afectan positivamente la dinámica de la transferencia de plásmidos (Beloin *et. al.*, 2008). Desde entonces, numerosos estudios que investigan la transferencia de plásmidos conjugativos y no conjugativos indican que el contacto físico entre las células donantes y receptoras es altamente favorecido dentro de las biopelículas de *E. coli* mono-específicas y mixtas, donde se ha demostrado una transferencia horizontal eficiente de material genético (Maeda *et. al.*, 2006). Además, esos estudios mostraron que es probable que tanto los plásmidos conjugativos como los no conjugativos tengan determinantes para el inicio y la arquitectura de la biopelícula, promoviendo así el desarrollo de la biopelícula, que a su vez afecta la extensión de la transferencia horizontal de genes mediada por el plásmido dentro de la biopelícula (Wuertz *et. al.*, 2004). Varias adhesinas celulares codificadas por genes en plásmidos o elementos genéticos móviles se han caracterizado en *E. coli* patógena, lo que sugiere que el conjunto de genes extracromosómicos (plásmidos y otros elementos genéticos móviles) también pueden constituir una fuente importante de factores de adhesión que conducen a la formación de biopelículas, que influyen tanto en la probabilidad de infección relacionada con la biopelícula como en la propagación de factores de virulencia transmitidos por plásmidos (Molin y Tolker-Nielsen 2003; Dudley *et. al.*, 2006).

#### **d) Motilidad de las bacterias impulsada por flagelos**

El flagelo bacteriano es un orgánulo filamentoso helicoidal responsable de la motilidad. En las especies bacterianas que poseen flagelos en el exterior de la célula, el largo filamento flagelar helicoidal actúa como un tornillo molecular para generar empuje.

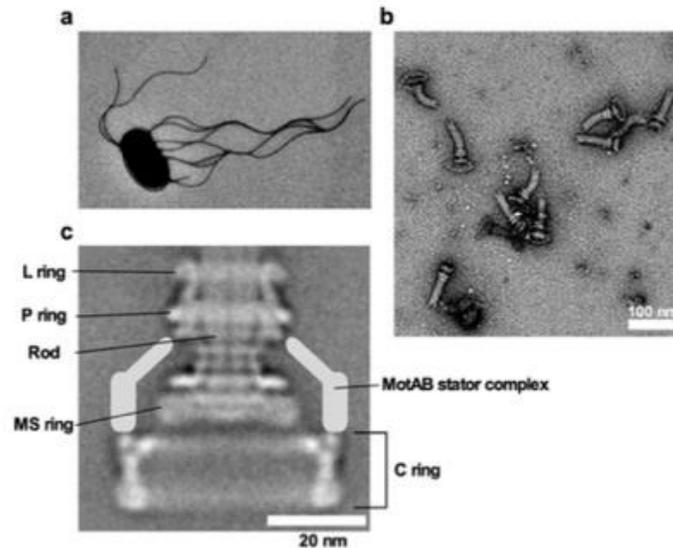
A pesar de la diversidad estructural de los flagelos entre las especies bacterianas, las bacterias flageladas comparten una nanomáquina rotativa común, a saber, el motor

flagelar, que se encuentra en la base del filamento. El motor flagelar está compuesto por un complejo de anillo de rotor y múltiples unidades de estator transmembrana y convierte el flujo de iones a través de un canal de iones de cada unidad de estator en el trabajo mecánico requerido para la rotación del motor. Las vías de señalización quimiotáctica intracelular regulan la dirección de la motilidad impulsada por los flagelos en respuesta a los cambios en los entornos, permitiendo que las bacterias migren hacia entornos más deseables para su supervivencia. Estudios experimentales y teóricos recientes han profundizado la comprensión de los mecanismos moleculares del motor flagelar (Nakamura y Minamino, 2019).

La motilidad bacteriana es un tema extremadamente intrigante desde varios aspectos científicos. Por ejemplo, la motilidad puede ser un atributo de virulencia crucial para las bacterias patógenas. La motilidad bacteriana también juega un papel importante en las simbiosis mutualistas. Además, las bacterias móviles también son un ejemplo representativo para comprender los principios físicos subyacentes que forman la base de los mecanismos de conversión de energía, generación de fuerza y acoplamiento mecanoquímico. Las motilidades activas de las bacterias están representadas por el movimiento en el líquido (por ejemplo, la motilidad de nado en *E. coli* y *Salmonella enterica*) y en superficies sólidas húmedas (por ejemplo, la motilidad en swarming impulsada por flagelos en *Proteus mirabilis* y *Vibrio parahaemolyticus*) (Jarrell y McBride 2008).

*E. coli* y *Salmonella* usan flagelos visibles desde el exterior de la célula como un filamento delgado, largo y helicoidal (**Figura 2a**). Ya sea que los flagelos bacterianos estén expuestos al exterior de la célula o estén ocultos dentro del cuerpo de la célula, el flagelo se divide en tres partes estructurales: el cuerpo basal como motor rotativo, el gancho como una articulación universal y el filamento como un tornillo molecular en común (**Figura 2b**), y la formación y función flagelar involucra más de 60 genes (Minamino e Imada, 2015). El cuerpo basal tiene múltiples estructuras de anillo, llamada anillo L, anillo P, anillo MS y anillo C (**Figura 2c**). Los anillos L y P, que están formados por la lipoproteína FlgH y la proteína periplásmica FlgI, respectivamente, están incrustados en la membrana externa y la capa de peptidoglicano (PG), respectivamente, y juntos actúan como un cojinete para la barra. Por el contrario, los anillos MS y C están

bien conservados entre las especies bacterianas (Terashima *et. al.*, 2017). El anillo MS está compuesto por la proteína transmembrana FliF y es parte de un rotor (Minamino *et. al.*, 2008). FliG, FliM y FliN forman el anillo C en la cara citoplasmática del anillo MS. El anillo C actúa no solo como una parte central del rotor para la generación de torque, sino también como un dispositivo estructural para cambiar la dirección de rotación del motor en *E. coli* y *Salmonella*.



**Figura 2. Componentes de flagelo bacteriano.**

a) Micrografía electrónica de célula bacteriana. La micrografía se tomó con una magnificación de 1200X b) Micrografía electrónica de cuerpos basales, ganchos aislados de células bacterianas  
c) Imagen de criomicroscopía electrónica de cuerpo basal purificado. El cuerpo basal purificado consiste en anillos L, P, MS, C y rod. Una docena de complejos MotAB están asociados con el cuerpo basal para actuar como una unidad de estator en los anillos del motor y la varilla. Una docena de complejos Mot están asociados con el cuerpo basal para actuar como una unidad de estator en el motor, pero desaparece durante la purificación. (Nakamura y Minamino 2019).

#### e) Movilidad tipo swarming (movimiento coordinado)

El swarming se define como una migración colectiva rápida de bacterias a través de una superficie, impulsada por flagelos y asistida por una amplia gama de adaptaciones fenotípicas (Partridge y Harshey 2013). Un atributo común de todos los swarming es un patrón de movimiento circular incesante, en el cual los paquetes de células que viajan en las mismas direcciones se dividen y fusionan, con un intercambio continuo de bacterias

entre los paquetes (Be'er y Ariel 2019). Este comportamiento difiere del movimiento de las bacterias en el líquido a granel, donde nadan individualmente (Berg 2003). En *E. coli*, la mecánica de los flagelos es similar durante la natación y el swarming en ese flagelo peritrico impulsado por motores rotativos bidireccionales que cambian entre las direcciones en sentido antihorario (CCW por counterclockwise) y en sentido horario (CW por clockwise). Sin embargo, mientras que la rotación CCW promueve la formación de un haz flagelar coherente que impulsa la célula hacia adelante (carrera) durante la natación y el swarming, un interruptor transitorio en la dirección de rotación (CW) hace que la célula se tambalee mientras nada, pero en la dirección inversa durante el swarming (Turner *et. al.*, 2010).

Muchas bacterias usan la motilidad impulsada por flagelos para enjambrear o moverse colectivamente sobre un terreno superficial. Las adaptaciones bacterianas para el swarming pueden incluir alargamiento celular, hiperflagelación, reclutamiento de proteínas de estator especiales y secreción de surfactante, entre otros. Recientemente se ha demostrado otra adaptación de enjambre en *E. coli*, en la que la vía de quimiotaxis se remodela para disminuir el sesgo de caída (aumentar la duración de la carrera), al aumentar también las velocidades de carrera (Partridge *et. al.*, 2020).

Anteriormente se ha informado una conexión entre la represión del swarming dependiente de c-di-GMP y la actividad de las proteínas del estator flagelar (Kuchma *et. al.*, 2015). Las proteínas del estator forman los canales de translocación de iones que son necesarios para generar torque para impulsar la rotación flagelar (Blair 2003). *P. aeruginosa* y sus parientes se distinguen de muchas otras bacterias flageladas porque tienen dos conjuntos de estatores dependientes de protones, MotAB y MotCD (Doyle *et. al.*, 2004; Toutain *et. al.*, 2005). Los estudios previos han demostrado que estos estatores desempeñan papeles distintos en el control de la motilidad de swarming asociado a la superficie: un conjunto de estatores promueve la motilidad de enjambre (MotCD), y un segundo conjunto (MotAB) evita la motilidad de enjambre (Baker *et. al.*, 2016).

La biosíntesis, el ensamblaje y la regulación de los flagelos de *E. coli* han sido objeto de una extensa investigación durante muchas décadas (Macnab 2003). La estructura de los flagelos contiene tres componentes distintos, el cuerpo basal, el gancho y un filamento extracelular compuesto por la proteína de la subunidad principal FliC o

flagelina. El FliC es altamente inmunogénico y la variación de secuencia dentro de su región central hipervariable define el marcador de serotipo diagnóstico de antígeno H de *E. coli* (Kakkanat *et al.*, 2017). La síntesis y ensamblaje de flagelos ocurre a través de un proceso altamente ordenado que involucra una combinación de mecanismos reguladores transcripcionales, traduccionales y postraduccionales. A nivel transcripcional, la regulación de los flagelos se coordina a través de una cascada jerárquica que involucra tres etapas de control (Aldridge y Hughes 2002); los reguladores maestros FlhDC controlan la primera etapa de este proceso. Numerosas proteínas reguladoras globales influyen en la expresión de flagelos regulando positiva o negativamente la transcripción de *flhDC* (Smith y Hoover 2009; Patrick y Kearns 2012). Los principales activadores transcripcionales de *flhDC* incluyen la proteína activadora de AMP-cíclica catabolito (CRP) (Soutourina *et al.*, 1999) la proteína de estructuración de nucleoidos (H-NS) similar a histona (Ko y Park 2000), los reguladores de *E. coli* B y C con detección de quórum (QseBC) (Sperandio *et al.*, 2002; Hadjifrangiskou *et al.*, 2011) y el regulador MatA del pilus común de *E. coli* (Lehti *et al.*, 2012).

Las bacterias Gram negativas han desarrollado redes reguladoras que utilizan puntos de control para controlar la expresión del gen flagelar y el proceso de ensamblaje. La vía biosintética y los mecanismos de función de los grandes y complejos organelos flagelares se conservan en bacterias entéricas que están peritricamente flageladas. La biosíntesis se basa en la expresión coordinada y temporal de más de 60 genes organizados en más de una docena de operones (Brown *et al.*, 2009). La jerarquía transcripcional del regulón flagelar consta de tres clases de promotores. En la parte superior de la cascada, bajo el promotor de clase 1, se encuentra el operón *flhDC*, que codifica el activador maestro transcripcional heteromultimérico *FlhD4C2* (Komeda, 1986). El activador maestro controla, junto con  $\sigma 70$ , los promotores de clase 2 de los genes que codifican el cuerpo basal-gancho.

El cambio entre la motilidad y la adhesión de bacterias, que puede considerarse como el "estilo de vida", está estrictamente influenciado por las condiciones ambientales. La motilidad celular se logra mediante la presencia de proteínas flagelares en la superficie celular. En *E. coli*, la síntesis de flagelos requiere más de 50 genes (**Figura 3**), que se pueden separar en tres grupos como genes tempranos, intermedios y tardíos. Los cambios

en las condiciones ambientales se perciben instantáneamente con la ayuda del regulador maestro flagelar (Ayyildiz *et. al.*, 2016). El regulador maestro de la síntesis flagelar en *E. coli*, FlhDC, inicia la activación transcripcional de los genes flagelares. Este regulador induce la expresión del factor sigma flagelar *fliA*, *flgM* y los genes que codifican la parte interna del flagelo que pertenece a los genes intermedios. Luego, los genes tardíos y los genes de quimiotaxis se expresan por *fliA* (Chilcott y Hughes 2000).

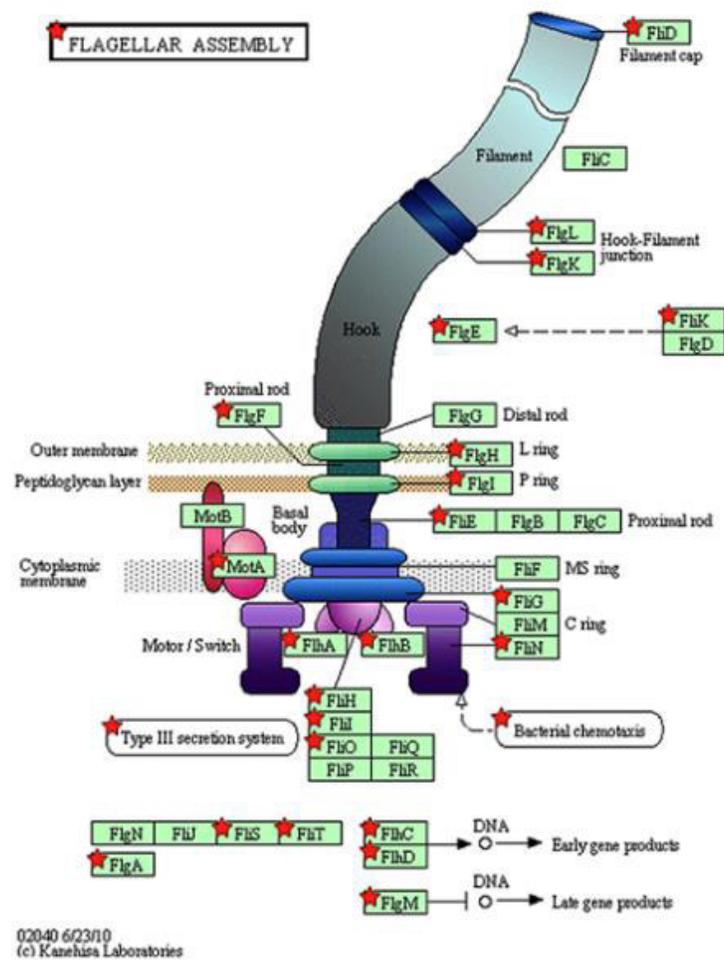


Figura 3. Genes de ensamble flagelar en *E. coli*.

Recuperado de KEGG. Los genes regulados están marcados con una estrella. (Kanehisa y Goto; Kanehisa *et. al.*, 2016).

## **Productos naturales**

La resistencia a los antimicrobianos es un desafío mundial creciente debido al uso generalizado y sin restricciones de antibióticos disponibles (Abreu *et. al.*, 2012; Llor y Bjerrum 2014; Tanwar *et. al.*, 2014). Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos antimicrobianos con nuevos mecanismos de acción es esencial para superar esta crisis en el aumento de la resistencia. En esta búsqueda, las plantas han demostrado ser fuentes ilimitadas de compuestos activos como fenólicos y polifenoles, quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos, cumarinas, terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos con un amplio espectro, y una gama de actividades biológicas diversas (Wink y Schimmer 2010). Los aceites esenciales (AE) se han utilizado como poderosos agentes antimicrobianos naturales contra una variedad de agentes patógenos. Debido a su naturaleza inherente, los AE se usan con frecuencia en productos alimenticios porque cumplen con los requisitos actuales de los consumidores que prefieren alimentos sin conservadores sintéticos (Piletti *et. al.*, 2017).

Muchos de estos compuestos naturales son reconocidos como sustancias seguras (GRAS) para su uso en los alimentos por la FDA (Food and Drug Administration) y no requieren necesariamente que se aprueben otras técnicas de análisis para su uso (Hill *et. al.*, 2013).

### **Citral**

El citral ( $C_{10}H_{16}O$  3,7-dimetil-2,6-octadien-1-al) es uno de los compuestos de aceites esenciales para los cuales se ha demostrado la acción antimicrobiana contra algunos microorganismos patógenos importantes. Es un aldehído monoterpeneo acíclico insaturado que se encuentra naturalmente en las hojas y frutos de varias especies de plantas, como los árboles de mirto, la albahaca africana, los limones, las limas, el limoncillo, las naranjas y la bergamota. Consiste en una mezcla de dos isómeros, geranial y neral, debido a su poderoso aroma a limón se utiliza para aromatizar bebidas a base de cítricos y otros productos (Somolinos *et. al.*, 2010).

Además, el citral es un aditivo alimentario generalmente reconocido como seguro (GRAS), y ha sido aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos para su uso en alimentos (FDA GRAS, 21 CFR 182.60). Además, el citral ha sido registrado por la Comisión Europea para su uso como saborizante en productos alimenticios porque su uso no representa un riesgo para la salud del consumidor (Burt, 2004). Teniendo en cuenta sus propiedades antimicrobianas, agradable aroma frutal y seguridad para los consumidores, el citral podría convertirse en un ingrediente antimicrobiano adecuado para un uso más amplio en la industria alimentaria.

Varios estudios experimentales y clínicos han demostrado que el citral tiene efectos antiinflamatorios y anticorrosivos favorables, y cada vez hay más pruebas de que el citral actúa como un agente fungicida y bactericida (Shi *et. al.*, 2016).

## **Eugenol**

Es el componente principal del aceite esencial de clavo con fórmula molecular  $C_{10}H_{12}O_2$  y ha demostrado un potencial biológico relevante con una acción antimicrobiana y antioxidante bien conocida. El eugenol, una sustancia natural utilizada como molécula objetivo para la fabricación de compuestos bioactivos, se aisló por primera vez en 1929 y su producción comercial comenzó en 1940 en los Estados Unidos (Da Silva *et. al.*, 2018). Se puede producir sintéticamente; sin embargo, se extrae principalmente de *Ocimum tenuiflorum*, *Cassia fistula*, *Zieria smithii* y *Pimenta racemosa*. Clasificado como un fenilpropanoide del tipo alil-fenol, el eugenol es un aceite amarillo pálido con olor y sabor picante a clavo. Con numerosas aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria, agrícola y cosmética (Kaufman 2015), mostró prometedores efectos antimicrobianos y antioxidantes (Nam y Kim 2013), cuando se evaluó contra los hongos *Cladosporium spp.* (Abbaszadeh *et. al.*, 2014). Otras actividades se informan en la literatura, como antivirales (Sun *et. al.*, 2016), y activo contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus* (Da Silva *et. al.*, 2018).

Entre los aceites esenciales, el eugenol (4-alil-2-metoxifenol) se reconoce por su sabor y aroma característicos y por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y medicinales (Woranuch y Yoksan 2013).

## **Hexanal**

Es un aldehído alifático volátil con fórmula molecular  $C_6H_{12}O$ . Este es utilizado en la industria de los aromas para producir sabores frutales. Su aroma se asemeja a la hierba recién cortada. Se produce cuando se alteran los tejidos de las plantas, provoca actividades antimicrobianas contra varios microorganismos responsables del deterioro de las frutas y hortalizas frescas. También se ha demostrado que el hexanal es eficaz para preservar los productos frescos al inhibir la fosfolipasa D, que cataliza la descomposición de las membranas en las células vegetales (Jash y Lim 2018).

## **Actividad de proteínas del choque térmico bacteriano**

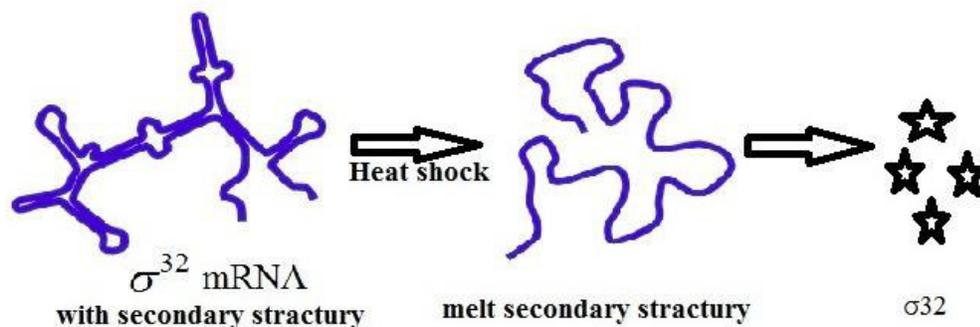
Las bacterias están expuestas a diferentes tipos de estrés en sus condiciones de crecimiento. Han desarrollado respuestas apropiadas, moduladas por la remodelación de complejos de proteínas y por sistemas de transducción de señales dependientes de la fosforilación, para adaptarse y sobrevivir en una variedad de naturaleza. Las proteínas son componentes esenciales para la actividad biológica en las células eucariotas y procariotas. Las proteínas de choque térmico (HSP) se han identificado de varios organismos y tienen un papel crítico en la homeostasis celular. Las chaperonas pueden detectar el medio ambiente y tener un papel potencial diferente en la evolución del organismo (Maleki *et al.*, 2016).

La respuesta al choque térmico implica la inducción de muchas proteínas llamadas proteínas de choque térmico, o HSP, en respuesta a las variaciones de temperatura. Los HSP incluyen chaperonas y proteasas que presumiblemente son esenciales para superar los cambios que implican la desnaturalización de proteínas. HSP juegan un papel importante en la patogénesis (Bohne *et al.*, 1994). En *E. coli*, la respuesta al choque térmico está controlada por el factor sigma-32 específico ( $\sigma_{32}$ ), este factor codificado por el gen *rpoH* y se une a los promotores de choque térmico ubicados ríos arriba de los genes de choque térmico (Straus *et al.*, 1987). Muchas chaperonas moleculares se han desarrollado para controlar el plegamiento de proteínas y la protección de la célula contra la aceleración de la temperatura (Street *et al.*, 2014). Las HSP incluyen a chaperonas y

proteasas que son necesarias para mantener la célula, en condiciones anormales como la desnaturalización de proteínas.

La regulación de HSP se basa en factores sigma alternativos que dirigen la ARN polimerasa a promotores específicos que difieren de los promotores básicos (housekeeping). Se han descrito dos factores sigma principales: sigma-32 y sigma-E ( $\sigma E$ ) (Model *et. al.*, 1997).

El factor sigma-32, codificado por el gen *rpoH* y regulado post transcripcionalmente, implica la estabilidad de la proteína y la eficiencia de la traducción. En condiciones normales, la cantidad de sigma-32 activo se mantiene baja. Las chaperonas inhiben la actividad de sigma-32 secuestrando a sigma-32 de la ARN-polimerasa. Esto se logra por la baja tasa de traducción de su ARNm que resulta del secuestro de la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio dentro de la estructura secundaria del ARNm de *rpoH* (Schumann *et. al.*, 2001). Después de un precipitado aumento de la temperatura, la estructura secundaria se elimina y mejora la traducción (Figura 4.) (Morita *et. al.*, 1999).



**Figura 4. Inducción traslacional por choque térmico.**

La inducción traslacional se debe a la temperatura de fusión de la estructura secundaria de RNAm de *rpoH* que produce el sigma-32 activo (Maleki *et al.*, 2016).

Todos los organismos desarrollaron programas genéticos para permitir su supervivencia en condiciones estresantes. En la mayoría de los casos, aumentan la cantidad de una clase específica de proteínas que se ocupan del factor de estrés y permiten que las células se adapten a condiciones potencialmente mortales. Una clase de proteínas

de estrés son las proteínas de choque térmico (HSP) cuya cantidad aumenta significativamente después de un aumento repentino de la temperatura. El estudio detallado de la regulación de la respuesta al choque térmico (HSR) se ha realizado en *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces spp.* Hasta ahora se han descrito dos mecanismos principales para regular la expresión de los HSG, llamados factores sigma alternativos y represores transcripcionales (Schumann 2016).

Los errores durante la síntesis de proteínas pueden ser el resultado de tensiones externas, como el tratamiento con aminoglucósidos, o fallas en la corrección de pruebas y el control de calidad de proteínas (Mohler e Ibba 2017). Cada uno de estos mecanismos da como resultado la producción de proteínas con aminoácidos incorrectos dentro del polipéptido. Estas proteínas mal traducidas a menudo dan como resultado productos proteicos no funcionales y mal plegados y un costo inherente a los mecanismos de control de calidad dentro de la célula. Bajo estrés severo de mala traducción, esto puede resultar en inhibición del crecimiento o muerte celular (Bullwinkle *et. al.*, 2014).

Para manejar el estrés de la acumulación de proteínas mal plegadas, las bacterias activan un factor sigma alternativo altamente conservador, sigma 32 (RpoH). La producción y activación de RpoH es compleja y altamente regulada debido a la naturaleza costosa de la respuesta al choque térmico (Evans *et. al.*, 2019). La activación de RpoH da como resultado la producción de proteasas y chaperonas, incluidas DnaK y GroEL, que replegan o degradan colectivamente las proteínas. Una vez que el conjunto de proteínas mal plegadas se ha manejado adecuadamente, estas proteasas degradan la RpoH, lo que resulta en una regulación dinámica y transitoria de la respuesta al choque térmico (Guisbert *et. al.*, 2004; 2008).

Curiosamente, los aislamientos silvestres de *E. coli* tienen una amplia gama de tasas de error ribosómico, lo que indica que, a pesar de su valor, los errores durante la traducción pueden ser beneficiosos en algunas condiciones. Estudios recientes han encontrado ejemplos de beneficios mecanicistas directos de mala traducción y amplios cambios fisiológicos debido a una mala traducción que puede ser beneficiosa para las células (Fan *et. al.*, 2015).

En el caso de los beneficios mecanicistas, el aumento de la incorporación incorrecta de metionina en proteínas puede aumentar la tolerancia al estrés oxidativo al

secuestrar los radicales de oxígeno lejos de las proteínas funcionales (Pan 2013). Además, el aumento de la traducción es suficiente para generar conjuntos de proteínas heterogéneas con ganancia de función que pueden ser resistentes a la unión a antibióticos (Javid *et. al.*, 2014). Los cambios fisiológicos en las células como resultado de una mala traducción pueden proteger las células preactivando las respuestas al estrés. Por ejemplo, el aumento de las tasas de dispersión activa el factor de respuesta general al estrés, RpoS, que protege a las células del futuro estrés oxidativo letal (Fredriksson *et. al.*, 2007).

## JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos patógenos cada día se adaptan a condiciones extremas de temperatura, pH, sequedad, atmósfera y antibióticos. Es importante investigar diferentes condiciones de crecimiento *in vitro* de los microorganismos para observar los factores fenotípicos y genotípicos que se modifican ya sean aumentando o disminuyendo su patogenicidad, y así poder diseñar estrategias de control.

Los antimicrobianos continúan estando entre los aditivos alimentarios más importantes. Actualmente, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados bajo diferentes atmósferas y temperaturas de conservación, está aumentando el interés por los antimicrobianos de origen natural que puedan extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil del alimento y la seguridad para el consumidor.

Por lo tanto, es urgente explorar agentes alternativos para combatir la formación de biopelículas, producción de toxinas, adherencia y movilidad de *E. coli* patogénica y así disminuir las enfermedades que originan.

## **HIPÓTESIS**

El citral, eugenol y hexanal y la temperatura afectan los procesos fisiológicos asociados con la virulencia en *E. coli* productora de toxina Shiga.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la influencia de productos naturales antimicrobianos y la temperatura en la virulencia de serotipos de *E. coli* productora de toxina Shiga.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto antimicrobiano de los productos naturales sobre el crecimiento de las cepas de *E. coli* productora de toxina Shiga.
2. Determinar el efecto de la combinación de productos naturales y choques térmicos sobre la viabilidad de las cepas de *E. coli* productora de toxina Shiga.
3. Determinar si la combinación de productos naturales y la temperatura afectan los procesos fisiológicos relacionados con la formación de biopelícula y la movilidad tipo swarming en las cepas de *E. coli* productora de toxina Shiga.
4. Demostrar el efecto en la combinación de los productos naturales y la temperatura en la expresión de genes relacionados con la formación de biopelícula, la movilidad tipo swarming, el choque térmico y la toxina Shiga 1.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Productos naturales

El citral natural (Pureza  $\geq 96\%$ , #W230316-SAMPLE-K, Lote: MKBH9971V), el eugenol (Pureza 99%, #E51791-100G, Lote: MKBJ0904V) y el hexanal (pureza  $\geq 95\%$ , #W2255726-25G-K, Lote: MKBJ9990V) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich México. Las soluciones stock se prepararon en agua destilada estéril con Tween 80 a una concentración de 1% e inmediatamente se esterilizaron por filtración antes de su uso para minimizar cualquier oxidación del compuesto.

### Cepas Bacterianas

Las cepas STEC serotipos O26 fue provista por la Dra. Lee Ann Jaykus del estado de Carolina del Norte, EE. UU., la STEC O103 se obtuvo del Centro de Referencia de *E. coli* en la Universidad Estatal de Pennsylvania, EE. UU., la STEC O111: MN (ATCC43887) donada por el Dr. Fernando Navarro (CINVESTAV, México), la cepa EHEC O157: H7 (ATCC 43895) y la cepa no patógena *E. coli* (NPEC) ATCC 25922 fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Lynn McLasborough, del Departamento de Ciencias de los Alimentos, Universidad de Massachusetts, Amherst MA, EE. UU. Todas las cepas fueron probadas en los ensayos de concentración mínima bactericida. Las cepas EHEC serotipo O157:H7 ATCC 43895 se tomó como control positivo de patogenicidad (*stx*) y la cepa no patógena EC ATCC 25922 como control negativo.

Todas las cepas fueron almacenadas en crioviales con caldo infusión cerebro corazón (BHI, Bioxon, México), con glicerol (Jalmek, México) al 20% (v/v) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Antes de cada experimento, de las cepas stock se tomaba una asada y se estriaba en agar BHI incubándose por 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se tomó una colonia aislada de la placa y se sembró en tubos de agar BHI en pico de flauta y se incubaron de manera antes mencionada, después se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para cada ensayo, de los tubos de agar BHI se transfería una asada a 5 ml de caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron por 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

La CMB fue determinada utilizando el método en tubo descrito por Castillo *et. al.* (2014) con algunas modificaciones. Para esto las cepas fueron activadas en tubos con 5 mL de caldo Mueller Hinton (MH) (Difco, USA), se dejaron incubar a 37°C por 24h. Posteriormente, se inocularon alícuotas de 10 µl de los cultivos activados ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) de las *E. coli* en tubos de cultivo que contenían 1 ml de caldo MH, más diferentes concentraciones de los agentes antimicrobianos (citral de 0.1% a 0.9%, eugenol de 0.1% a 1% y hexanal de 1% a 5%) o caldo MH (Difco, USA) estéril como control. Los cultivos se incubaron a 37°C por 24h. La supervivencia bacteriana (crecimiento/ausencia de crecimiento) se determinó mediante el plaqueo de 100 µl del cultivo en placas de agar MH incubándose a 37°C por 24h. La CMB se definió como la concentración más baja de agentes antimicrobianos que inhibían el crecimiento en la placa de agar Mueller Hinton.

### **Choque térmico y determinación de concentraciones subinhibitorias**

Los ensayos de choque térmico se realizaron curvas de crecimiento utilizando las cepas *E. coli* ATCC 25922 no patógena, EHEC serotipo O157:H7 y la STEC serotipo O26. Se activaron las tres cepas por separado en caldo LB y se dejaron en crecimiento a 37°C por 18-24h. En resumen, se ajustaron los cultivos al 1% de densidad en caldo LB, se agregaron los agentes antimicrobianos a las siguientes concentraciones respectivas: citral (0.1% y 0.05%), eugenol (0.25% y 0.1%) y hexanal (0.5% y 0.25%), se incubaron a 37°C por 6-8h. Transcurrido el tiempo de incubación se dio un choque térmico subletal a 46°C por 60 min e inmediatamente después un choque térmico letal a 55°C por 60 min más. Los recuentos de las células viables se realizaron por diluciones decimales seriadas en NaCl al 0.85% en los tiempos cero (antes del choque subletal) y luego cada 20 min de la incubación. Se sembraron alícuotas de 0.1 mL en agar ACP (Agar cuenta en placa) por duplicado y después se incubaron a 37°C por 48h.

## **Efecto de los agentes antimicrobianos y choque térmico en la motilidad swarming**

Los ensayos de motilidad swarming se realizaron siguiendo la metodología descrita por Lee *et. al.*, (2013) con algunas modificaciones. El caldo LB (Bioxon, México) con 0.3% (p/v) de agar bacteriológico y los agentes antimicrobianos citral 0.1%, eugenol 0.25% y hexanal 0.5%, fueron utilizados para el ensayo de motilidad swarming. Las cepas de EC, EHEC y STEC fueron crecidas a 37°C por 16-18h con agitación orbital a 200 rpm. Para cada una de las cepas se sembró una placa de agar semisólido LB en el centro con 3 µL de inóculo, las placas se sometieron a choque térmico (descrito anteriormente, con temperaturas de crecimiento de 37°C, choque subletal a 46°C y choque letal a 55°C). Se utilizaron placas de agar semisólido LB sin choque y sin agentes antimicrobianos, las cuales se utilizaron como control de las cepas sin choque, y se incubaron durante 10h a 37°C.

## **Ensayo *in vitro* para la formación de biopelícula en microplacas de poliestireno**

El ensayo de formación de biopelícula se realizó siguiendo la metodología de Wang *et. al.*, (2012) con algunas modificaciones. Para evaluar la formación de biopelícula se utilizó el ensayo de tinción con cristal violeta (CV), las cepas bacterianas se cultivaron durante la noche tal como se ha descrito anteriormente para alcanzar una concentración celular de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Posteriormente, el cultivo fue diluido en caldo LB estéril al 1% y se añadió a placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Corning, NY) conteniendo 200 µl de caldo LB con las concentraciones subinhibitorias de cada uno de los agentes antimicrobianos citral (0.1% y 0.05%), eugenol (0.25% y 0.1%) y hexanal (0.5% y 0.25%), las placas se sometieron al choque térmico anteriormente descrito y se incubaron estáticamente a 37°C hasta 24h. Después de la incubación, los sobrenadantes en cada pocillo se colectaron suavemente por aspiración y se determinó el crecimiento planctónico bacteriano midiendo la A630 nm utilizando un lector de microplacas (Epoch multivolumen). Las placas se lavaron con 200 µL por pocillo de una solución tamponada de fosfatos estéril (PBS, pH 7.2) para separar las células ligeramente unidas, después se secaron al aire y se tiñeron con 100 ml por pocillo de CV al 0.1% durante 20 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo con PBS

y se dejaron secar al aire, el CV restante se disolvió en 100  $\mu$ L por pocillo de etanol al 85%. La cantidad de CV extraído en cada pocillo se determinó midiendo la  $A_{570}$  usando el lector de microplacas. Los datos obtenidos son promedios a partir de al menos cinco pocillos replicados. Los experimentos se realizaron cuatro veces usando cultivos independientes.

El grado de formación de biopelícula se determinó de acuerdo con lo descrito por Naves *et. al.*, (2008) aplicando tres fórmulas diferentes: (i)  $BF = AB - CW$ , donde BF es la formación de biopelícula, AB es la  $DO_{570nm}$  de bacterias teñidas y adheridas, CW es la  $DO_{570nm}$  en el control teñido libre de bacterias solo medio LB; ii)  $BF = AB / CW$  y iii)  $SBF = (AB - CW) / G$  en donde IFB es el índice de formación de biopelícula específico y G es la  $DO_{630nm}$  del crecimiento de células en cultivo suspendido. La guía utilizada para interpretar las lecturas de SBF se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación semicuantitativa de la formación de biopelícula.(Teh *et. al.*, 2010)

Fuerte (F)	Moderado (M)	Débil (D)	No formador (N)
$\geq 1.10$	0.70 – 1.09	0.35 – 0.69	< 0.35

### **Extracción de RNA para Biopelícula**

Las condiciones de crecimiento se realizaron de acuerdo con lo descrito por Carvalhais *et. al.*, (2013) con algunas modificaciones. En resumen, se activaron las cepas *E. coli* ATCC 25922 no patógena, EHEC serotipo O157: H7 y la STEC serotipo O26 y se incubaron a 37°C en caldo LB toda la noche. Después se realizó una dilución 1:100 con caldo LB estéril y se cultivaron durante 24h en placas de 12 pocillos a 37°C (Yadav *et. al.*, 2015) con los agentes antimicrobianos y choques térmicos descritos anteriormente con un volumen final por pocillo de 500 µL. Después de 24h, las biopelículas fueron lavadas con solución tamponada de fosfatos estéril (PBS) para ser suspendidas en TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Bioline, UK), posteriormente se pasaron las biopelículas a tubos Eppendorf conservados en hielo, seguido de una centrifugación a 1200xg por 10 min a 4°C.

### **Obtención de las células en swarming para extracción de RNA**

La obtención de células para el análisis de expresión de genes para motilidad swarming se realizó siguiendo la metodología descrita por Lee *et. al.*, (2013) con algunas modificaciones. En resumen, se cultivaron células de las *E. coli* ATCC 25922 no patógena, EHEC serotipo O157: H7 y la STEC serotipo O26 en caldo LB se incubaron a 37°C con agitación (200 rpm) por 16-18h. Las células bacterianas ya crecidas se inocularon con alícuotas de 3 µl de cada cepa en el centro de agar LB al 0.3% previamente preparado con los agentes antimicrobianos anteriormente descritos. Se incubaron a 37°C por 24h y aplicando los choques térmicos descritos anteriormente. Las células se lavaron de la superficie de agar LB al 0.3% en 2 ml de PBS y se centrifugaron a 12000xg por 10 min a 4°C, al precipitado obtenido se le agregó TRIZOL<sup>®</sup> Reagent.

## **Extracción de RNA, síntesis de cDNA y cuantificación RT-PCR**

El RNA total se extrajo y se purificó a partir de muestras bacterianas tratadas con los agentes antimicrobianos citral (0.1%), eugenol (0.25%) y hexanal (0.5%) y con choques térmicos con temperaturas subletal a 46°C y letal a 55°C, usando TRIzol<sup>®</sup> Reagent, siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se convirtió en cDNA utilizando el kit de transcripción inversa (iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis kit, Bio-Rad) con un régimen de termociclado de 25°C por 5 min, 42°C por 30 min y 85°C por 5 min. Se realizó la PCR cuantitativa (qPCR) utilizando un sistema de tiempo real PCR (Pikoreal 96 Thermo Scientific) e iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad cat#170-8880) con las siguientes condiciones de termociclado: 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 5s y 58°C por 30s. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se describen en la **tabla 2**. Los genes GAPDH y 16S, se utilizaron para normalizar y comparar los niveles de expresión de genes diana detectados entre cepas bacterianas tratadas y cepas control (sin tratamientos) mediante la medición de los cambios en el número de veces de expresión génica utilizando el método de  $\Delta\Delta C_t$  (Livak y Schmittgen, 2001).

## **Análisis Estadístico**

Todos los ensayos se realizaron en al menos dos ensayos independientes y con tres o más repeticiones. Mediante un análisis de ANOVA se realizaron comparaciones entre tratamientos y se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para hacer comparaciones con el software SPSS versión 23 (IBM Corp. Armonk, NY). La significancia utilizada fue del 95%.

Tabla 2. Genes y oligonucleótidos utilizados para expresión génica en STEC.

Gen	Proceso fisiológico relacionado	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>csgD</i>	Regulador maestro biopelícula	F-CCGCTTGTGTCCGGTTTT R- GAGATCGCTCGTTCGTTGTTC	97	Chen <i>et. al.</i> , 2010
<i>csgA</i>	Codifica a proteína estructural de las fimbrias curli	F- TGGCAGGTGTTGTCCTCAGT R- GTCAGAGTTACGGGCATCAGTTT	146	Chen <i>et. al.</i> , 2010
<i>flhD</i>	Regulador de biosíntesis flagelar	F -ACCTCCGAGTTGCTGAAACAC R -TTGCTGGAGATCGTCAACGC	261	Allison <i>et. al.</i> , 2012
<i>flhC</i>	Regulador de biosíntesis flagelar	F- CGGCAGGATTCTGGGAAAGT R- CTGGACATTGGTGCGGTTTG	173	Para este estudio, 2015
<i>rpoH</i>	Controla la respuesta de choque térmico	F-ATGACTGACAAAATGCAAAG R- AGCGCCCGCTCCTCGTCAGC	110	Hase <i>et. al.</i> , 2013
<i>rpoE</i>	Respuestas al choque térmico y tensiones en la membrana	F- ACGCCTGATAAGCGGTTGAA R- ATGGCAATAACCTTGCGGGA	144	Para este estudio, 2015
<i>rpoS</i>	Regulador de estrés en general	F- TTCGTTTGCCGATTCACATC R- TCTCTTCCGCACTTGGTTCA	99	Liu <i>et. al.</i> , 2010
<i>stx1</i>	Toxina Shiga 1	F-TGCATCGCTTTTCATTTTTTCA R-CCACCTTCCAGTTACACAATCAG	65	Dowd, 2007
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Housekeeping)	F- TCCGTGCTGCTCAGAAACG R- CACTTTCTTCGCACCAGCG	299	Carey <i>et. al.</i> , 2008

## RESULTADOS

### Efecto de los productos naturales sobre el crecimiento bacteriano

Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) para las cepas STEC O103, O26, O111, EHEC O157:H7 ATCC 43895 (EHEC) y EC ATCC 25922 (NPEC); utilizando citral, eugenol y hexanal como agentes antimicrobianos. Al comparar la eficiencia de los productos naturales (**Tabla 3**), se demostró que, en todas las cepas, el eugenol mostró una mejor actividad bactericida al presentar la concentración mínima bactericida más baja, seguida por la establecida para el citral, que fue mayor en todas las cepas evaluadas; dejando hexanal como el menos eficiente, presentando la CMB más alta en todas las cepas, esto en contraste con lo obtenido con los productos mencionados anteriormente (ANOVA, posthoc Tukey,  $p < 0.05$ ). Por otro lado, al comparar la efectividad bactericida de citral en todas las cepas, se observó una CMB más alta con una diferencia significativa al tratar STEC O26 (1.26 mg/mL), en contraste con el obtenido con el resto de las cepas, siendo la CMB más baja del citral en STEC O111 (0.86 mg/mL), que no presentaron diferencias significativas con las concentraciones establecidas para NPEC ATCC 25922 (0.94 mg/mL), STEC O103 (1 mg/mL) y EHEC O157: H7 (1 mg/mL). Tomando como referencia el uso de eugenol, se presentó la CMB más baja al aplicar el tratamiento en NPEC ATCC 25922 (0.58 mg/mL), seguido en orden ascendente y presentando diferencia estadística, con la presentada en EHEC O157H7 (0.66 mg/mL), que fue menor ( $p < 0.05$ ) a la establecida en STEC O26 (0.71 mg/mL), O103 (0.73 mg/mL) y O111 (0.73 mg/mL), que no presentaron diferencias significativas entre ellos. Al comparar la actividad antimicrobiana de hexanal entre las cepas evaluadas, se observó que el extracto fue menos eficiente, ya que presentó una CMB más alta en STEC O26 (2.42 mg/mL) y EHEC O157: H7 (2.52 mg/mL), sin mostrar una diferencia significativa entre ellos; en contraste con los 2.24 mg/mL observados en STEC O103, O111 y NPEC ATCC 25922, que fueron estadísticamente más bajos que los mencionados anteriormente, siendo hexanal más eficiente en estas tres últimas cepas. Las cepas que presentaron una menor concentración de CMB de hexanal no fueron diferentes, significativamente.

Tabla 3. Concentraciones mínimas bactericidas (CMB mg/mL) de compuestos naturales para el crecimiento de cinco serotipos de *E. coli*.

Agentes antimicrobianos	CMB mg/mL				
	STEC O103	STEC O26	STEC O111	EHEC O157:H7	NPEC ATCC 25922
Citral	1.00 ± 0.03 <i>b</i>	1.26 ± 0.05 <i>a</i>	0.86 ± 0.05 <i>b</i>	1.00 ± 0.07 <i>b</i>	0.94 ± 0.15 <i>b</i>
Eugenol	0.73 ± 0.02 <i>a</i>	0.71 ± 0.01 <i>a</i>	0.73 ± 0.02 <i>a</i>	0.66 ± 0.01 <i>b</i>	0.58 ± 0.04 <i>c</i>
Hexanal	2.24 ± 0.05 <i>b</i>	2.42 ± 0.08 <i>a</i>	2.24 ± 0.05 <i>b</i>	2.52 ± 0.11 <i>a</i>	2.24 ± 0.05 <i>b</i>

± desviación estándar. Se hicieron comparaciones entre las cepas con el mismo compuesto. Las mismas letras indican similitud estadística (p<0.05)

## Efecto de los productos naturales, choque térmico y su combinación sobre los factores de virulencia de las STEC

### a) Formación de biopelícula

La evaluación del efecto de los diferentes tratamientos sobre la cepa STEC O103, se determinó analizando el IFB (índice de formación de biopelícula) resultante al utilizar la técnica *in vitro* por microtitulación en placa (**Tabla 4**), los resultados obtenidos en los productos naturales (citral, eugenol y hexanal) en combinación con choque térmico fueron eugenol con IFB= 0.0024; hexanal IFB= 0.0027; y citral IFB= 0.0242, y el eugenol aplicado individualmente (IFB=0.0243) observando que estos tratamientos previenen la formación de biopelícula, no observó diferencias entre ellas. Al aplicar el choque térmico (IFB=0.0636), tampoco se observó la formación de biopelícula, presentando similitud estadística solo con la obtenida de los tratamientos con eugenol y citral combinado con calor. Analizando el IFB del control (IFB=0.1299) y del hexanal (IFB=0.2256), se observa de la misma manera que se mencionó anteriormente, que la cepa no forma biopelícula, sin embargo, el índice determinado para ambos tratamientos presenta diferencias significativas entre ellos, y con los tratamientos ya mencionados. Al aplicar el citral individualmente (IFB=0.3404), se observa un IFB cercano a débil formación de biopelícula, considerando que el tratamiento es menos efectivo (p < 0.05).

Al evaluar el efecto de los tratamientos sobre la formación de biopelícula por STEC O26, el eugenol (IFB=0.0120), el eugenol en combinación con choque térmico (IFB=0.0012) y citral en combinación con choque térmico (IFB=0.0023) no permitió la formación de biopelícula, no mostraron diferencias estadísticas con el citral (IFB=0.0707) con el resto de los tratamientos ( $p < 0.05$ ). El hexanal en combinación con choque térmico (IFB=0.1147) presentó un IFB estadísticamente más alto que los tratamientos antes mencionados, con la excepción de lo determinado a partir del tratamiento con citral. Al comparar los tratamientos con hexanal (IFB=0.8045), choque térmico (IFB=2.4032) y el control (IFB=2.7369), se presentaron diferencias significativas, en orden ascendente y entre ellos, permitiendo la formación moderada de biopelícula en el caso de hexanal, y una fuerte formación de biopelícula en la cepa tratada con los otros dos tratamientos mencionados.

Considerando STEC O111, todos los tratamientos, con la excepción de hexanal (IFB=0.8056), evitaron la formación de biopelículas, presentando un IFB correspondiente a la formación moderada de biopelículas. El eugenol y el citral, ambos tratamientos en combinación con choque térmico (IFB=0.0013 e IFB=0.0014, respectivamente), presentaron un IFB significativamente más bajo que el de la cepa tratada con choque térmico (IFB=0.0207), que es estadísticamente más bajo que el índice de la cepa tratada con eugenol (IFB=0.0413). El control (IFB=0.1012) y el hexanal en combinación con choque térmico (IFB=0.1034) no muestran diferencias significativas entre ellos, y a su vez tienen una tasa significativamente más alta que los tratamientos antes mencionados, y significativamente más baja que la determinada por el tratamiento con citral (IFB=0.2262) ( $p < 0.05$ ).

Usando EHEC O157: H7 como referencia, se observa que cuando se trata con citral (IFB=0.3300), se obtiene un IFB cercano al correspondiente a una formación de biopelícula débil, siendo el tratamiento con el IFB más alto. La cepa tratada con eugenol (IFB=0.1991) no permitió la formación de biopelícula, presentando una tasa significativamente más baja que el tratamiento mencionado anteriormente, y estadísticamente más alta que la tasa proporcionada por el control (IFB=0.0896). El resto de los tratamientos no muestran diferencias entre ellos, siendo significativamente menores que los tratamientos mencionados anteriormente ( $p < 0.05$ ).

La cepa NPEC ATCC 25922 presentó un IFB correspondiente a una biopelícula moderada en el control (IFB=0.7120), siendo significativamente mayor que el índice de la cepa tratada con choque térmico (IFB=0.3007), que no permite la formación de biopelícula. El hexanal (IFB=0.1618) y el eugenol (IFB=0.1324) no muestran diferencias entre ellos, siendo estadísticamente más altos que el resto de los tratamientos.

Tabla 4. Efecto de la combinación de los productos naturales y el choque térmico sobre la formación de biopelícula. Las concentraciones de citral, eugenol y hexanal fueron de 0.1%, 0.25% y 0.5% respectivamente.

<b>Cepas</b>	<b>Control</b>	<b>Citral</b>	<b>Eugenol</b>	<b>Hexanal</b>	<b>HS</b>	<b>Citral + HS</b>	<b>Eugenol + HS</b>	<b>Hexanal + HS</b>
<b>STEC O103</b>	0.1299 ± 0.0403c <i>N</i>	0.3404 ± 0.0325e <i>N</i>	0.0243 ± 0.0037ab <i>N</i>	0.2256 ± 0.0282d <i>N</i>	0.0636 ± 0.0064b <i>N</i>	0.0242 ± 0.0122ab <i>N</i>	0.0024 ± 0.0012a <i>N</i>	0.0027 ± 0.0008a <i>N</i>
<b>STEC O26</b>	2.7369 ± 0.1158e <i>F</i>	0.0707 ± 0.0054ab <i>N</i>	0.0120 ± 0.0021a <i>N</i>	0.8045 ± 0.0124c <i>M</i>	2.4032 ± 0.0603d <i>F</i>	0.0023 ± 0.0004a <i>N</i>	0.0012 ± 0.0002a <i>N</i>	0.1147 ± 0.0194b <i>N</i>
<b>STEC O111</b>	0.1012 ± 0.0148d <i>N</i>	0.2262 ± 0.0153e <i>N</i>	0.0413 ± 0.0033c <i>N</i>	0.8056 ± 0.0065f <i>M</i>	0.0207 ± 0.0038b <i>N</i>	0.0014 ± 0.0005a <i>N</i>	0.0013 ± 0.0002a <i>N</i>	0.1034 ± 0.0138d <i>N</i>
<b>EHEC O157:H7</b>	0.0896 ± 0.0052b <i>N</i>	0.3300 ± 0.0464d <i>N</i>	0.1991 ± 0.0292c <i>N</i>	0.0014 ± 0.0005 <sup>a</sup> <i>N</i>	0.0205 ± 0.0018a <i>N</i>	0.0011 ± 0.0003a <i>N</i>	0.0013 ± 0.0003a <i>N</i>	0.0011 ± 0.0005a <i>N</i>
<b>NPEC</b>	0.7120 ± 0.1011d <i>M</i>	0.0104 ± 0.0011a <i>N</i>	0.1324 ± 0.0371b <i>N</i>	0.1618 ± 0.0695b <i>N</i>	0.3007 ± 0.0508c <i>N</i>	0.0014 ± 0.0004a <i>N</i>	0.0014 ± 0.0005a <i>N</i>	0.0014 ± 0.0007a <i>N</i>

± desviación estándar. Las mismas letras indican similitud estadística ( $p < 0.05$ ). Índice de formación de biopelículas IFB. N = No formadora con un IFB =  $< 0.35$ , D = Débil con un IFB =  $0.35 - 0.69$ , M = Moderado con un IFB =  $0.70 - 1.09$  y F = Fuerte con un IFB =  $\geq 1.10$ .

Por otro lado, se procedió a determinar las diferencias entre las cepas evaluadas, luego de su respectivo tratamiento (**Tabla 5**). Después de aplicar el tratamiento con citral, se observó que NPEC ATCC 25922 (IFB=0.0104) presentaba una mayor susceptibilidad, siendo el índice estadísticamente más bajo determinado junto con en STEC O26 (IFB=0.0707) presentando diferencias entre estas dos cepas. En STEC O111 (IFB=0.2262) presentó una tasa significativamente mayor que los tratamientos antes mencionados; caso no observado en comparación con EHEC O157: H7 (IFB=0.3300) y STEC O103 (IFB=0.3404), que no mostraron diferencias entre ellos ( $p < 0.05$ ). Como resultado de la aplicación de citral en combinación con choque térmico, la STEC O103 (IFB=0.0242) presentó el IFB más alto significativamente que el resto de las cepas tratadas, mostrando un IFB hasta 10 veces más alto que el resto de los tratamientos. Es importante mencionar que el 100% de las cepas tratadas bajo esta modalidad no formaron biopelícula.

La determinación de IFB después de la aplicación de eugenol mostró que STEC O26 (IFB=0.0120), STEC O103 (IFB=0.0243) y STEC O111 (IFB=0.0413) no presentaron diferencias significativas entre ellos. Al igual que las cepas, NPEC ATCC 25922 (IFB=0.1324) y EHEC O157: H7 (IFB=0.1991), no formaron biopelículas, sin embargo, presentan diferencias significativas entre ellas, siendo EHEC O157: H7 presentó un IFB más alto. Después de aplicar este tratamiento, se descubrió que todas las cepas no forman biopelículas. Cuando se combinó eugenol con choque térmico, todas las cepas no formaron una biopelícula, además de no mostrar diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ). Es importante mencionar que este tratamiento es 10 veces más efectivo que el tratamiento con eugenol, individualmente.

La evaluación del tratamiento posterior al hexanal indicó que STEC O26 (IFB=0.8045) y STEC O111 (IFB=0.8056) mostraron una formación moderada de biopelícula, siendo estadísticamente similares entre sí. En orden descendente, NPEC ATCC 25922 (IFB=0.1618) y STEC O103 (IFB=0.2256) no formaron biopelícula, siendo significativamente similares entre sí y, a su vez, significativamente menos que los tratamientos antes mencionados. Por último, se encontró EC O157:H7 con el IFB más bajo (IFB=0.0014), en relación con el determinado en el resto de las cepas tratadas ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, cuando se evalúa el hexanal junto con el choque térmico, se observa

que todas las cepas tratadas no muestran formación de biopelículas; determinado en EHEC O157: H7 (IFB=0.0011), NPEC ATCC 25922 (IFB=0.0014) y STEC O103 (IFB=0.0027) mostraron índices significativamente más bajos que los establecidos en STEC O111 (IFB=0.1034) y STEC O26 (IFB=0.1147).

Al someter las cepas a choque térmico, se determinaron los IFB donde STEC O26 era la única cepa que presentaba formación de biopelícula (IFB=2.4032), caracterizando una formación fuerte. Este índice fue significativamente mayor que el determinado en NPEC ATCC 25922 (IFB=0.3007), que, a su vez, fue mayor que los determinados en EHEC O157: H7 (IFB=0.0205), STEC O111 (IFB=0.0207) y STEC O103 (IFB=0.0636), no se mostraron diferencias significativas entre ellas. En el caso del control, STEC O26 (IFB=2.7369) y NPEC ATCC 25922 (IFB=0.7120) presentaron tasas de formación de biopelículas fuertes y moderadas, respectivamente; siendo significativamente diferente entre ellos y del resto de las cepas. EHEC O157:H7 (IFB=0.0896), STEC O111 (IFB=0.1012) y STEC O103 (IFB=0.1299) no formaron biopelículas y no mostraron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ).

Tabla 5. Determinación del uso de productos naturales y choque térmico sobre la formación de biopelícula en las cepas de *E. coli*. Las concentraciones de citral, eugenol y hexanal fueron de 0.1%, 0.25% y 0.5% respectivamente.

Tratamientos	STEC O103	STEC O26	STEC O111	EHEC O157:H7	NPEC ATCC 25922
<b>Control</b>	0.1299 ± 0.0403a <i>N</i>	2.7369 ± 0.1158c <i>F</i>	0.1012 ± 0.0148a <i>N</i>	0.0896 ± 0.0052a <i>N</i>	0.7120 ± 0.1011b <i>M</i>
<b>Citral</b>	0.3404 ± 0.0325d <i>D</i>	0.0707 ± 0.0054b <i>N</i>	0.2262 ± 0.0153c <i>N</i>	0.3300 ± 0.0464d <i>N</i>	0.0104 ± 0.0011a <i>N</i>
<b>Eugenol</b>	0.0243 ± 0.0037a <i>N</i>	0.0120 ± 0.0021a <i>N</i>	0.0413 ± 0.0033a <i>N</i>	0.1991 ± 0.0292c <i>N</i>	0.1324 ± 0.0371b <i>N</i>
<b>Hexanal</b>	0.2256 ± 0.0282b <i>N</i>	0.8045 ± 0.0124c <i>M</i>	0.8056 ± 0.0065c <i>M</i>	0.0014 ± 0.0005a <i>N</i>	0.1618 ± 0.0695b <i>N</i>
<b>HS</b>	0.0636 ± 0.0064a <i>N</i>	2.4032 ± 0.0603c <i>F</i>	0.0207 ± 0.0038a <i>N</i>	0.0205 ± 0.0018a <i>N</i>	0.3007 ± 0.0508b <i>N</i>
<b>Citral + HS</b>	0.0242 ± 0.0122b <i>N</i>	0.0023 ± 0.0004a <i>N</i>	0.0014 ± 0.0005a <i>N</i>	0.0011 ± 0.0003a <i>N</i>	0.0014 ± 0.0004a <i>N</i>
<b>Eugenol + HS</b>	0.0024 ± 0.0012a <i>N</i>	0.0012 ± 0.0002a <i>N</i>	0.0013 ± 0.0002a <i>N</i>	0.0013 ± 0.0003a <i>N</i>	0.0014 ± 0.0005a <i>N</i>
<b>Hexanal + HS</b>	0.0027 ± 0.0008a <i>N</i>	0.1147 ± 0.0194b <i>N</i>	0.1034 ± 0.0138b <i>N</i>	0.0011 ± 0.0005a <i>N</i>	0.0014 ± 0.0007a <i>N</i>

± desviación estándar. Las mismas letras indican similitud estadística ( $p < 0.05$ ). Índice de formación de biopelículas IFB. N = No formadora con un IFB =  $< 0.35$ , D = Débil con un IFB =  $0.35 - 0.69$ , M = Moderado con un IFB =  $0.70 - 1.09$ , F = Fuerte con un IFB =  $\geq 1.10$ .

## b) Movilidad Swarming

Para establecer el efecto de los tratamientos sobre la movilidad swarming de las cepas, se establecieron diferencias entre las medias de los centímetros del diámetro de migración bacteriana (**Tabla 6**).

En STEC O103 se encontró que el hexanal combinado con el choque térmico (1.0 cm) influyó en las bacterias presentando una mayor movilidad que el resto de los tratamientos, caso contrario a lo observado en el control (0.3 cm), el citral (0.3 cm), el hexanal (0.3 cm) y el eugenol (0.3 cm), que no mostraron movilidad que el resto de los tratamientos, sin mostrar diferencias entre ellos. El eugenol junto con el choque térmico (0.6 cm) y el efecto de la temperatura individualmente (0.8 cm) presentaron diferencias significativas entre ellos; el fenómeno no ocurrió con citral en combinación con choque térmico (0.7 cm), que fue estadísticamente similar a ambos ( $p < 0.05$ ).

El efecto de los tratamientos en STEC O26 mostró que el eugenol (4.3 cm), el citral con choque térmico (4.4 cm) y el control (4.5 cm) presentaron significativamente diámetros más pequeños que los del resto de los tratamientos; que no presentaron diferencias significativas entre sí (Eugenol + choque térmico = 5.1 cm; hexanal = 5.1 cm; choque térmico = 5.3 cm; hexanal + choque térmico = 5.3 cm; y citral = 5.4 cm).

El swarming analizado en STEC O111 mostró que el control (0.5 cm) y el tratamiento de choque térmico (0.5 cm) no presentaron difusión en comparación con el resto de los tratamientos. Los centímetros medidos después de tratar la cepa con citral en combinación con choque térmico (1.0 cm) y el hexanal (1.5 cm) presentaron diferencias significativas, siendo esta última donde la cepa migró más centímetros. El resto de los tratamientos fueron estadísticamente similares a este último (Hexanal + choque térmico = 1.3 cm; eugenol = 1.4 cm; citral = 1.4 cm; y eugenol + choque térmico = 1.5 cm).

El efecto de los tratamientos sobre EHEC O157: H7 mostró que cuando se trata con eugenol en combinación con choque térmico (4.5 cm), la migración fue menor que la de los otros tratamientos; caso contrario al hexanal (7.0 cm) y el eugenol (7.4 cm), donde la cepa migró la mayor cantidad de centímetros, significativamente mayor que el resto de los tratamientos. El resto de los tratamientos son significativamente más altos que el eugenol en combinación con choque térmico, y más bajos que los últimos tratamientos

mencionados (citral = 5.4 cm; hexanal + choque térmico = 5.5 cm; choque térmico = 5.5 cm; control = 5.5 cm; citral + choque térmico = 5.6 cm).

Analizando el NPEC ATCC 25922, el efecto del choque térmico (1.7 cm) condujo a una menor migración significativamente similar al efecto de hexanal (1.9 cm) y eugenol (2.0 cm), este último sin mostrar diferencias significativas en relación con el efecto de citral (2.1 cm) y hexanal (2.3 cm), ambos en combinación con choque térmico. La movilidad obtenida del tratamiento con eugenol en combinación con el choque térmico (2.4 cm) es significativamente mayor que el obtenido con hexanal, un caso que no se observó con los tratamientos antes mencionados. La migración bacteriana de la cepa tratada con citral (2.6 cm) es significativamente mayor que la obtenida después del tratamiento con eugenol y citral en combinación con choque térmico; diámetro que no presenta diferencias significativas con el tratamiento de control (2.8 cm) y el eugenol combinado con choque térmico ( $p < 0.05$ ).

Tabla 6. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en cinco serotipos de *E. coli* STEC sobre el movimiento tipo swarming.

Cepas	Migración Swarming (cm diámetro)							
	Control	Citral	Eugenol	Hexanal	HS	Citral + HS	Eugenol + HS	Hexanal + HS
<b>STEC O103</b>	0.3 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.7 ± 0.03 <sup>bc</sup>	0.6 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.05 <sup>d</sup>
<b>STEC O26</b>	1.3 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.09 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.36 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.06 <sup>b</sup>
<b>STEC O111</b>	0.5 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.18 <sup>bc</sup>	1.4 ± 0.21 <sup>bc</sup>	1.5 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.5 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.11 <sup>bc</sup>	1.3 ± 0.29 <sup>bc</sup>
<b>EHEC O157:H7</b>	5.5 ± 0.21 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.07 <sup>b</sup>	7.4 ± 0.27 <sup>c</sup>	7.0 ± 0.08 <sup>c</sup>	5.5 ± 0.16 <sup>b</sup>	5.6 ± 0.08 <sup>b</sup>	4.5 ± 0.11 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.27 <sup>b</sup>
<b>NPEC ATCC 25922</b>	2.8 ± 0.05 <sup>e</sup>	2.6 ± 0.05 <sup>de</sup>	2.0 ± 0.29 <sup>bc</sup>	1.9 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.7 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.06 <sup>bc</sup>	2.4 ± 0.18 <sup>cde</sup>	2.3 ± 0.08 <sup>bcd</sup>

± desviación estándar. Las mismas letras indican similitud estadística (p<0.05).

De manera complementaria, en el presente estudio, se determinaron las diferencias y el efecto de los tratamientos para las cepas en la movilidad (**Tabla 7**), donde, después de la aplicación de citral, se observó que STEC O103 presentó una migración significativamente menor (0.3 cm) que el resto de las cepas. STEC O26 (5.4 cm) y EHEC O157: H7 (5.4 cm) mostraron una mayor migración en relación con el resto de los tratamientos, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. En orden descendente, y mostrando una movilidad significativamente menor, están los centímetros determinados en NPEC ATCC 25922 (2.6 cm) y STEC O111 (1.4 cm), cepas que presentaron migración bacteriana con diferencias significativas entre ellos ( $p < 0.05$ ).

Después de tratar las cepas con citral en combinación con choque térmico, se observó que STEC O103 (0.7 cm) presentaba menos migración en relación con el resto de las cepas. En orden ascendente, y presentando diferencias significativas entre ellos ( $p < 0.05$ ), se establecen las migraciones de STEC O111 (1.0 cm), NPEC ATCC 25922 (2.1 cm), STEC O26 (4.4 cm) y EHEC O157:H7 (5.6 cm); fenómeno similar al observado después del tratamiento con eugenol, donde la movilidad fue significativamente diferente entre todas las cepas; expresado en orden ascendente de la siguiente manera: STEC O103 (0.3 cm), STEC O111 (1.4 cm), NPEC ATCC 25922 (2.0 cm), STEC O26 (4.3 cm) y EHEC O157: H7 (7.4 cm).

Analizando los centímetros de migración microbiana de las cepas después de su tratamiento con eugenol más choque térmico, se observan diferencias significativas entre todas las cepas, donde STEC O26 (5.1 cm) presentó una mayor migración, siguiendo en orden descendente EHEC O157: H7 (4.5 cm), NPEC ATCC 25922 (2.4 cm), STEC O111 (1.5 cm) y STEC O103 (0.5 cm) ( $p < 0.05$ ).

Un fenómeno similar al mencionado anteriormente se describe en las cepas tratadas con hexanal, donde todas las cepas mostraron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ). La cepa con la mayor movilidad fue EHEC O157:H7 (7.0 cm), y la migración más baja ocurrió en STEC O103 (0.3 cm); en orden ascendente, teniendo en cuenta lo último, se observó la movilidad de STEC O111 (1.5 cm), NPEC ATCC 25922 (1.9 cm) y STEC O26 (5.1 cm).

La combinación de choque térmico con hexanal, STEC O103 (1.0 cm) y STEC O111 (1.3 cm) tuvieron menos migración, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. EHEC O157:H7 (5.5 cm) y STEC O26 (5.3 cm) presentaron un mayor movimiento, sin ser significativamente diferentes entre sí, en contraste con NPEC ATCC 25922 (2.3 cm), con un diámetro significativamente menor que las últimas cepas mencionadas.

Se establecieron diferencias significativas en la movilidad de las cepas cultivadas en condiciones normales; el control, donde STEC O103 (0.3 cm) y STEC O111 (0.5 cm) presentaron un menor movimiento bacteriano en relación con el resto de las cepas, sin mostrar diferencias significativas entre sus migraciones. De mayor a menor migración, se establecieron las de EHEC O157:H7 (5.5 cm), STEC O26 (4.5 cm) y NPEC ATCC 25922 (2.8 cm), que presentaron diferencias significativas entre ellas.

En el caso de las cepas tratadas con choque térmico, se observa que la migración de EHEC O157:H7 (5.5 cm) y STEC O26 (5.3 cm) fue significativamente mayor que la del resto de las cepas, sin mostrar diferencias significativas entre ellas. El movimiento de NPEC ATCC 25922 (1.7 cm) fue significativamente mayor que el de STEC O103 (0.8 cm), que a su vez fue significativamente mayor que el observado en STEC O111 (0.5 cm) ( $p < 0.05$ ).

Tabla 7. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en cinco serotipos de *E. coli* STEC sobre el movimiento tipo swarming.

Tratamientos	Migración Swarming (cm)				
	STEC O103	STEC O26	STEC O111	EHEC O157:H7	NPEC ATCC 25922
<b>Control</b>	0.3 ± 0.05 $a$	4.5 ± 0.12 $c$	0.5 ± 0.06 $a$	5.5 ± 0.21 $d$	2.8 ± 0.05 $b$
<b>Citral</b>	0.3 ± 0.05 $a$	5.4 ± 0.13 $d$	1.4 ± 0.18 $a$	5.4 ± 0.07 $d$	2.6 ± 0.29 $c$
<b>Eugenol</b>	0.3 ± 0.04 $a$	4.3 ± 0.09 $d$	1.4 ± 0.21 $b$	7.4 ± 0.27 $e$	2.0 ± 0.09 $c$
<b>Hexanal</b>	0.3 ± 0.03 $a$	5.1 ± 0.09 $d$	1.5 ± 0.10 $b$	7.0 ± 0.08 $e$	1.9 ± 0.13 $c$
<b>HS</b>	0.8 ± 0.10 $b$	5.3 ± 0.02 $d$	0.5 ± 0.03 $a$	5.5 ± 0.16 $d$	1.7 ± 0.09 $c$
<b>Citral + HS</b>	0.7 ± 0.03 $a$	4.4 ± 0.09 $d$	1.0 ± 0.15 $b$	5.6 ± 0.08 $e$	2.1 ± 0.06 $c$
<b>Eugenol + HS</b>	0.5 ± 0.10 $a$	5.1 ± 0.36 $e$	1.5 ± 0.11 $b$	1.3 ± 0.11 $d$	2.4 ± 0.18 $c$
<b>Hexanal + HS</b>	1.3 ± 0.05 $a$	5.3 ± 0.06 $c$	1.3 ± 0.29 $a$	5.5 ± 0.27 $c$	2.3 ± 0.08 $b$

± desviación estándar. Las mismas letras indican similitud estadística ( $p < 0.05$ ).

## Expresión de genes relacionados con la virulencia STEC O26

### a) Formación de biopelícula

Para estimar la expresión de los genes relacionados con la formación de biopelículas, se realizó una normalización de los datos con el gen GAPDH (gen de control) como referencia, caracterizado por presentar una expresión constitutiva y constante, que se definió como 1; en relación con la expresión de este gen, la diferencia en la expresión (+) o represión (-) de los genes se determinó por el efecto de los tratamientos con un cambio de pliegue resultante de la diferencia de la expresión del gen y la expresión del gen de control (**Tabla 8**). A partir de estas medias, se establecieron diferencias significativas para cada uno de los genes en STEC O26 (ANOVA, Tukey,  $p = 0.05$ ).

La expresión del gen *csgA* de STEC O26 después de ser tratado con citral (0.2) fue de -0.8 en relación con el control, siendo significativamente similar al tratamiento con eugenol (0.7), con una expresión de -0.3; el último tratamiento sin mostrar diferencias significativas con el control fue el hexanal en combinación con el choque térmico (0.8), con una expresión de -0.2. El choque térmico (5.5) condujo a una expresión de +4.5, significativamente más alta que la del resto de las expresiones genéticas. Las expresiones resultantes del tratamiento con citral (3.7) y eugenol (3.7), ambos en combinación con choque térmico, presentaron una expresión de + 2.7, respectivamente; no presentando diferencias significativas entre sí. El tratamiento con hexanal (1.4) no fue estadísticamente diferente del control, a pesar de tener una expresión de + 0.4.

El gen *csgD* se presentó a niveles significativamente diferentes del control, después del tratamiento con eugenol (0.7) y citral (0.8), con expresiones de -0.3 y -0.2, respectivamente; fenómeno similar al observado en la expresión del gen después de ser tratado con hexanal (1.0), que, a pesar de no presentar diferencias estadísticas, tiene una expresión de +0.035. El tratamiento de choque térmico (1.3), con una expresión de +0.3, fue significativamente mayor que el observado en eugenol y citral; caso no observado en comparación con control y hexanal.

Para este gen, se determinó una expresión de + 0.9 después del tratamiento de choque térmico combinado de hexanal (1.9), y una expresión de + 1.1 del citral en combinación con choque térmico (2.1); Estos tratamientos no presentan diferencias significativas entre

sí. La expresión genética promovida por el eugenol combinado con choque térmico (4.5) fue de +3.5 en relación con el control, significativamente mayor que la del resto de los tratamientos.

La expresión del gen *rpoE* fue significativamente mayor después de la aplicación de todos los tratamientos, esto en relación con el control. El choque térmico (2.0), la combinación del choque térmico tanto con citral (2.5) como con hexanal (2.6) presentaron una expresión de +1.0, +1.5 y +1.6, respectivamente, sin observar diferencias significativas entre ellos; caso contrario al observado en la expresión después del tratamiento con citral (2.9) y eugenol (3.0), presentando una expresión de +1.9 y +2.0, respectivamente; estos son significativamente más altos que la expresión debido al choque térmico, y estadísticamente similares a las expresiones mencionadas anteriormente. Con una expresión de +3.9, la determinación resultante del tratamiento con hexanal (4.9) fue significativamente mayor que los tratamientos mencionados anteriormente, observándose el caso opuesto en comparación con el producto de expresión del tratamiento con eugenol combinado con choque térmico (5.8), con una cuantificación de +4.8.

Después del tratamiento de la cepa con citral (0.5) y hexanal (0.8), no hubo diferencias significativas en la expresión del gen *rpoH*, con expresiones determinadas en -0.5 y -0.2, respectivamente; ambos sin mostrar diferencias significativas entre ellos, y el control. La expresión determinada después del tratamiento con citral en combinación con choque térmico (1.7) fue +0.7, significativamente mayor que la obtenida con eugenol y hexanal en combinación con choque térmico; esto sin mostrar diferencias significativas con el resto de las expresiones genéticas.

La expresión del gen *rpoS* se determinó después de aplicar los tratamientos individualmente (hexanal = 0.1; eugenol = 0.1; y citral = 0.2) presentaron expresiones de -0.9, -0.9 y -0.8, en relación con el control, siendo estos significativamente menor que el resto de las expresiones obtenidas. La expresión influenciada por el citral en combinación con el choque térmico (0.8), y el obtenido después de aplicar el choque térmico (1.3), no mostró diferencias significativas con el control, a pesar de que el citral combinado con choque térmico tenía una expresión de -0.2 y el tratamiento físico +0.3. El hexanal (1.8) y eugenol (2.1), ambos combinados con calor condujeron a una expresión de +0.8 y +1.1, siendo estadísticamente diferentes entre sí.

Al analizar la expresión del gen *stxI*, se observa una expresión significativamente mayor en tratamientos con eugenol (3.3) y citral (2.8), ambos en combinación con choque térmico, lo que resulta en expresiones de +2.3 y +1.8, respectivamente; lo anterior en relación con el resto de las expresiones, destacando que no hay una diferencia significativa entre ellas. El tratamiento con eugenol (0.3) y con choque térmico (1.4) condujo a expresiones (-0.7 y + 0.4, respectivamente) con diferencias significativas entre ellos, sin observar el mismo fenómeno al compararlos por separado con el resto de las expresiones obtenidas.

Tabla 8. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en la expresión de genes relacionados a biopelícula en STEC O26.

<b>Genes</b>	<b>Control</b>	<b>Citral</b>	<b>Eugenol</b>	<b>Hexanal</b>	<b>HS</b>	<b>Citral + HS</b>	<b>Eugenol + HS</b>	<b>Hexanal + HS</b>
<i>csgA</i>	1.0 ± 0.0bc	0.2 ± 0.1a	0.7 ± 0.0ab	1.4 ± 0.3c	5.5 ± 0.4e	3.7 ± 0.1d	3.7 ± 0.1d	0.8 ± 0.1b
<i>csgD</i>	1.0 ± 0.0ab	0.8 ± 0.1a	0.7 ± 0.0a	1.0 ± 0.3ab	1.3 ± 0.1b	2.1 ± 0.1c	4.5 ± 0.0d	1.9 ± 0.3c
<i>rpoE</i>	1.0 ± 0.0a	2.9 ± 0.2c	3.0 ± 0.1c	4.9 ± 0.1d	2.0 ± 0.3b	2.5 ± 0.4bc	5.8 ± 0.1e	2.6 ± 0.4bc
<i>rpoH</i>	1.0 ± 0.0abc	0.5 ± 0.2a	1.5 ± 0.3bc	0.8 ± 0.4ab	1.6 ± 0.0bc	1.7 ± 0.3c	1.5 ± 0.3bc	1.4 ± 0.4bc
<i>rpoS</i>	1.0 ± 0.0bc	0.2 ± 0.0a	0.1 ± 0.0a	0.1 ± 0.0a	1.3 ± 0.3c	0.8 ± 0.1b	2.1 ± 0.0e	1.8 ± 0.2d
<i>stx1</i>	1.0 ± 0.0ab	1.3 ± 0.2ab	0.3 ± 0.0a	0.5 ± 0.0ab	1.4 ± 0.5b	2.8 ± 0.9c	3.3 ± 0.3c	1.4 ± 0.2ab

Todos los genes fueron normalizados (GAPDH) y comparados con el control. Todos los experimentos se compararon el control ANOVA (p <0.05).

Además del análisis de la expresión génica en relación con el control, analizamos las diferencias entre la expresión de los seis genes cuando se tratan con el mismo tratamiento (**Tabla 9**), de modo que sea posible dilucidar su comportamiento, al comparar entre sí. Después del tratamiento con citral, se observó que los genes con la expresión más baja eran *rpoS* (0.2), *csgA* (0.2) y *rpoH* (0.5), este último sin mostrar diferencias significativas con lo que se determinó en el gen *csgD* (0.8). Bajo este tratamiento, el gen de *stx1* (1.3) y *rpoE* (2.9) se expresaron en gran medida, mostrando diferencias significativas entre ellos. El efecto de citral con el choque térmico condujo a que los genes *rpoS* (0.8) y *rpoH* (1.7) mostraran menos expresión, no siendo significativamente diferentes entre sí; caso no observado con este último gen, que no presentó diferencias estadísticas con la expresión de *csgD* (2.1), *rpoE* (2.5) y *stx1* (2.8). El gen con la expresión determinada más alta fue *csgA* (3.7), siendo significativamente similar a *stx1*.

La expresión de los genes en STEC O26 después del tratamiento con eugenol mostró que *rpoS* (0.1) y *stx1* (0.3) mostraron una expresión significativamente menor en relación con el resto de los genes, sin diferencias significativas observadas entre ellos. Del mismo modo, *csgA* (0.7) y *csgD* (0.7) no mostraron diferencias entre ellos, siendo estadísticamente menores que las expresiones de *rpoH* (1.5) y *rpoE* (3.0), significativamente diferentes entre sí. Después del tratamiento de STEC O26 con eugenol combinado con choque térmico, se determinó una mayor expresión, en relación con el resto de los genes, en *rpoE* (5.8) y *csgD* (4.5), significativamente diferentes entre sí. Los genes *csgA* (3.7) y *stx1* (3.3) no mostraron diferencias significativas entre ellos, caso contrario en comparación con *rpoS* (2.1) y *rpoH* (1.5), significativamente diferentes entre sí.

La expresión resultante del tratamiento con hexanal mostró que la expresión entre *rpoS* (0.1) y *stx1* (0.5) no mostró diferencias significativas entre ellos, donde el último gen fue significativamente similar a la expresión de *rpoH* (0.8) y *csgD* (1.0). La expresión de *csgA* (1.4) fue significativamente mayor que la de *stx1*, no se observaron diferencias con la expresión de *rpoH* y *csgD*. El gen *rpoE* (4.9) presentó una expresión significativamente más alta que la del resto de los genes ( $p = 0.05$ ).

Al complementar el hexanal con el choque térmico, el gen *rpoE* (2.6) se expresó de manera significativamente similar a *csgD* (1.9), siendo estadísticamente más alto que el

resto de los genes. La expresión de *csgA* (0.8), *stx1* (1.4) y *rpoH* (1.4) no presentaron diferencias significativas entre ellos, la expresión de estos dos últimos genes fue estadísticamente similar a la de *rpoS* (1.8) y *csgD* (1.9).

El tratamiento de STEC O26 con choque térmico condujo a una expresión significativamente mayor, que la del resto de los genes, en *csgA* (5.5). La expresión de *rpoS* (1.3), *csgD* (1.3), *stx1* (1.4), *rpoH* (1.6) y *rpoE* (2.0) no mostró diferencias significativas entre ellos.

Tabla 9. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en la expresión de genes relacionados a biopelícula en STEC O26.

Tratamientos	Genes					
	<i>csgA</i>	<i>csgD</i>	<i>rpoE</i>	<i>rpoH</i>	<i>rpoS</i>	<i>stxI</i>
<b>Control</b>	1	1	1	1	1	1
<b>Citral</b>	0.2 ± 0.1a	0.8 ± 0.1b	2.9 ± 0.2d	0.5 ± 0.2ab	0.2 ± 0.0a	1.3 ± 0.2c
<b>Eugenol</b>	0.7 ± 0.0b	0.7 ± 0.0b	3.0 ± 0.1d	1.5 ± 0.3c	0.1 ± 0.0a	0.3 ± 0.0a
<b>Hexanal</b>	1.4 ± 0.3c	1.0 ± 0.3bc	4.9 ± 0.1d	0.8 ± 0.4bc	0.1 ± 0.0a	0.5 ± 0.0ac
<b>HS</b>	5.5 ± 0.4b	1.3 ± 0.1a	2.0 ± 0.3a	1.6 ± 0.0a	1.3 ± 0.3a	1.4 ± 0.5a
<b>Citral + HS</b>	3.7 ± 0.1c	2.1 ± 0.1b	2.5 ± 0.4b	1.7 ± 0.3ab	0.8 ± 0.1a	2.8 ± 0.9bc
<b>Eugenol + HS</b>	3.7 ± 0.1c	4.5 ± 0.0d	5.8 ± 0.1e	1.5 ± 0.3a	2.1 ± 0.0b	3.3 ± 0.3c
<b>Hexanal + HS</b>	0.8 ± 0.1a	1.9 ± 0.3bc	2.6 ± 0.4c	1.4 ± 0.4ab	1.8 ± 0.2b	1.4 ± 0.2ab

Todos los genes fueron normalizados (GAPDH) y comparados con el control. Todos los experimentos se compararon el control ANOVA (p <0,05).

## b) Movilidad Swarming

Bajo los mismos criterios de análisis de la expresión de los genes de biopelícula, se determinaron las diferencias y el cambio de pliegue de los genes relacionados con la movilidad de STEC O26, como producto de la exposición a los tratamientos antes mencionados, en contraste con la expresión constitutiva y constante de GADPH gen (**tabla 10**).

En el caso del gen *flhC*, se observa que las expresiones STEC O26 después del tratamiento con hexanal (0.4) y citral (0.7), presentaron -0.6 y -0.3, respectivamente, esto sin ser significativamente diferente de la expresión de control. El efecto del eugenol (4.5) condujo a una expresión de +3.5, significativamente mayor que el resto de las expresiones. El choque térmico (2.5) y el hexanal en combinación con el choque térmico (2.2) indujeron una expresión de +1.5 y +1.2, respectivamente, siendo significativamente similares entre sí; este último comparando con la expresión de +0.7 resultante del tratamiento con citral combinado con choque térmico (1.7) no presentaron diferencias significativas entre ellos; sin embargo, este último fue significativamente similar a la expresión de +0.5, producto del eugenol combinado con choque térmico (1.5).

La expresión del gen *flhD* observada después de tratar STEC O26 con choque térmico combinado hexanal (0.2) y hexanal individualmente (0.2) fue -0.8, respectivamente, siendo menor que la expresión de control y sin mostrar diferencias significativas entre ellos. El citral combinado con choque térmico (1.0) e individualmente (1.0) presentó expresiones de -0.027 y +0.006, sin mostrar diferencias significativas entre ellos y el control. En orden ascendente, y mostrando diferencias significativas entre ellos, en relación con los tratamientos ya descritos, la cepa tratada con eugenol combinado choque térmico (1.1), eugenol (1.4) y choque térmico (2.0) promovió expresiones de +0.1, +0.4 y +1.0, respectivamente.

En el análisis de las expresiones del gen *rpoE*, se observa que la expresión de -0.7, producto del tratamiento con hexanal combinado con choque térmico (0.3), es significativamente menor que el control y el resto de las expresiones; caso contrario a la expresión +1.9 producto del tratamiento con choque térmico (2.9), significativamente mayor que el control y el resto de los tratamientos. Las expresiones de +0.7 y +0.8 de

eugenol (1.7) y citral (1.8), respectivamente, no mostraron diferencias significativas entre ellas, siendo, por otro lado, significativamente mayores que el resto de las expresiones que no mostraron diferencias entre ellos y la expresión de control ( $p < 0.05$ ).

Teniendo en cuenta la respuesta del gen *rpoH*, se observa que el efecto del choque térmico (1.6) condujo a una expresión de +0.6 más alta que la del resto de las expresiones resultantes. La expresión +0.1 producto del tratamiento con citral (1.1) fue significativamente mayor que la expresión -0.4, -0.3 y -0.2 del producto de los tratamientos con choque térmico combinado eugenol (0.6), hexanal combinado con choque térmico (0.7) y esté individualmente (0.8), las dos últimas expresiones son estadísticamente similares a la expresión constitutiva del control.

En el caso de las expresiones del gen *rpoS*, se observa que la expresión de -0.5 resultado de la exposición a citral con choque térmico (0.5), fue significativamente menor que el resto de los tratamientos y a la expresión de control, esta última sin mostrar diferencias significativas con la expresión de +0.2 resultante del tratamiento con eugenol choque térmico combinado (1.2), que fue estadísticamente similar a la expresión de +0.2 del tratamiento con choque térmico combinado hexanal (1.2) y +0.3 con choque térmico (1.3). Las expresiones +0.7 y +0.8, resultantes de los tratamientos con citral (1.7) y eugenol (1.8), no mostraron diferencias significativas entre ellas, un fenómeno observado contrario con la expresión de +1.2, producto de exposición al hexanal (2.2).

La expresión del gen *stx1* de -0.8, producto de la exposición de STEC O26 al citral combinado con choque térmico (0.2) fue menor que la del resto de los tratamientos; contrariamente a la expresión de +1.3 resultante del tratamiento con eugenol combinado de choque térmico (2.3), que fue significativamente mayor que la del resto de los tratamientos. Las expresiones de +0.1, +0.3 y +0.3, como resultado de la exposición a citral (1.1), hexanal combinado con choque térmico (1.3) y choque térmico (1.3) respectivamente, no muestran diferencias significativas entre sí y la expresión de control. El tratamiento con eugenol (1.4) condujo a una expresión de +0.4, significativamente similar a la expresión de +0.7 producida por de hexanal (1.7); Las expresiones de estos últimos no mostraron diferencias significativas entre ellos.

Tabla 10. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en la expresión de genes relacionados a swarming en STEC O26.

<b>Genes</b>	<b>Control</b>	<b>Citral</b>	<b>Eugenol</b>	<b>Hexanal</b>	<b>HS</b>	<b>Citral + HS</b>	<b>Eugenol + HS</b>	<b>Hexanal + HS</b>
<i>flhC</i>	1.0 ± 0.0ab	0.7 ± 0.1a	4.5 ± 0.4f	0.4 ± 0.0a	2.5 ± 0.2e	1.7 ± 0.1cd	1.5 ± 0.4bc	2.2 ± 0.1de
<i>flhD</i>	1.0 ± 0.0b	1.0 ± 0.0b	1.4 ± 0.1d	0.2 ± 0.0a	2.0 ± 0.0e	1.0 ± 0.0b	1.1 ± 0.1c	0.2 ± 0.0a
<i>rpoE</i>	1.0 ± 0.0b	1.8 ± 0.0c	1.7 ± 0.2c	1.0 ± 0.0b	2.9 ± 0.2d	0.8 ± 0.1b	0.8 ± 0.1b	0.3 ± 0.0a
<i>rpoH</i>	1.0 ± 0.0bcd	1.1 ± 0.0d	1.1 ± 0.0cd	0.8 ± 0.0abc	1.6 ± 0.1e	1.0 ± 0.3bcd	0.6 ± 0.1a	0.7 ± 0.1ab
<i>rpoS</i>	1.0 ± 0.0b	1.7 ± 0.0d	1.8 ± 0.1d	2.2 ± 0.1e	1.3 ± 0.0c	0.5 ± 0.0a	1.2 ± 0.0bc	1.2 ± 0.0c
<i>stx1</i>	1.0 ± 0.0b	1.1 ± 0.1b	1.4 ± 0.1cd	1.7 ± 0.0d	1.3 ± 0.1bc	0.2 ± 0.0a	2.3 ± 0.3e	1.3 ± 0.1bc

Todos los genes fueron normalizados (GAPDH) y comparados con el control. Todos los experimentos se compararon el control ANOVA (p <0,05).

Por otro lado, se determinaron las diferencias significativas entre la expresión de los genes, de modo que es posible determinar el gen que se expresó en mayor o menor medida, bajo exposición a cada tratamiento (**Tabla 11**).

Se observó que después del tratamiento con citral, los genes *rpoS* (1.7) y *rpoE* (1.8) no mostraron diferencias significativas en su expresión, siendo mayores que la del resto de los genes. La expresión de *rpoH* (1.1), *stx1* (1.1) y *flhD* (1.0) fue significativamente mayor que la de *flhC* (0.7), sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Al combinar el citral con el choque térmico, *flhC* (1.7) se expresó significativamente más que el resto de los genes. La expresión de los genes *rpoH* (1.0), *flhD* (1.0) y *rpoE* (0.8) no mostró diferencias significativas entre ellos, caso contrario en contraste con la expresión de *stx1* (0.2). El gen *rpoS* (0.5) no mostró diferencias con la expresión de *stx1* y *rpoE*.

El tratamiento con eugenol hizo que la expresión de *flhC* (4.5) fuera más alta que la del resto de los genes. La expresión de *rpoS* (1.8) fue significativamente mayor que la de *rpoH* (1.1), un fenómeno que no se presenta al comparar estos, individualmente, con la expresión del resto de los genes. Después del efecto de eugenol con choque térmico, se observó una expresión significativamente mayor que la del resto de los genes en *stx1* (2.3). La expresión de *flhC* (1.5) no presentó diferencias significativas con la de *rpoS* (1.2) y *flhD* (1.1); observando la diferencia con la expresión de *rpoE* (0.8) y *rpoH* (0.6). La expresión de *flhD* no mostró diferencias en relación con el resto de los genes, excepto *stx1*.

La expresión de *flhD* (0.2) y *flhC* (0.4), después del tratamiento con hexanal, no mostró diferencias significativas cuando se comparó entre ellos, caso contrario en comparación con el resto de los genes. La expresión de *rpoH* (0.8), *rpoE* (1.0), *stx1* (1.7) y *rpoS* (2.2) presentó diferencias significativas comparados entre sí. La expresión de genes resultantes del tratamiento de hexanal con choque térmico, se observó que *flhC* (2.2) fue, significativamente mayor que la del resto de los tratamientos, la expresión de los genes de *stx1* (1.3) y *rpoS* (1.2) no difieren entre sí. La expresión de *rpoH* (0.7) fue significativamente mayor que la de *rpoE* (0.3) y *flhD* (0.2), lo que no mostró diferencias significativas entre los últimos dos.

La expresión resultante como consecuencia de la exposición al choque térmico indujo la expresión de *rpoE* (2.9) y *flhC* (2.5) fue significativamente mayor que la del resto de

los tratamientos, sin mostrar diferencias entre ellos. El gen *flhD* (2.0) presentó una expresión mayor que la de *rpoH* (1.6), *stx1* (1.3) y *rpoS* (1.3), que no mostró diferencias significativas entre ellos.

Tabla 11. Efecto de los productos naturales, el choque térmico y su combinación en la expresión de genes relacionados a swarming en STEC O26.

Tratamientos	Genes					
	<i>flhC</i>	<i>flhD</i>	<i>rpoE</i>	<i>rpoH</i>	<i>rpoS</i>	<i>stx1</i>
<b>Control</b>	1	1	1	1	1	1
<b>Citral</b>	0.7 ± 0.1a	1.0 ± 0.0b	1.8 ± 0.0c	1.1 ± 0.0b	1.7 ± 0.0c	1.1 ± 0.1b
<b>Eugenol</b>	4.5 ± 0.4c	1.4 ± 0.1ab	1.7 ± 0.2ab	1.1 ± 0.0a	1.8 ± 0.1b	1.4 ± 0.1ab
<b>Hexanal</b>	0.4 ± 0.0a	0.2 ± 0.0a	1.0 ± 0.0c	0.8 ± 0.0b	2.2 ± 0.1e	1.7 ± 0.0d
<b>Heat Shock</b>	2.5 ± 0.2c	2.0 ± 0.0b	2.9 ± 0.2c	1.6 ± 0.1a	1.3 ± 0.0a	1.3 ± 0.1a
<b>Citral + HS</b>	1.7 ± 0.1d	1.0 ± 0.0c	0.8 ± 0.1bc	1.0 ± 0.3c	0.5 ± 0.0ab	0.2 ± 0.0a
<b>Eugenol + HS</b>	1.5 ± 0.4c	1.1 ± 0.1abc	0.8 ± 0.1ab	0.6 ± 0.1a	1.2 ± 0.0bc	2.3 ± 0.3d
<b>Hexanal + HS</b>	2.2 ± 0.1d	0.2 ± 0.0a	0.3 ± 0.0a	0.7 ± 0.1b	1.2 ± 0.0c	1.3 ± 0.1c

Todos los genes fueron normalizados (GAPDH) y comparados con el control. Todos los experimentos se compararon el control ANOVA (p <0,05).

## DISCUSIÓN

Los antimicrobianos de origen natural han demostrado afectar varios procesos bacterianos. El eugenol es un aceite esencial extraído del clavo, conocido por su capacidad antioxidante (Jirovetz *et. al.*, 2006). En estudios anteriores, el eugenol mostró actividad bacteriostática y bactericida contra bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Salmonella*) y bacterias Gram positivas (*Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*) (Filgueiras *et. al.*, 2006). Las propiedades antimicrobianas pueden deberse a la alteración de la membrana celular; el eugenol es hidrofóbico e interactúa con la membrana celular, lo que provoca fugas de componentes intracelulares debido a la permeabilidad no específica (Gili y Holley 2006, Burt 2004). En nuestro estudio, el eugenol fue el compuesto con el mayor efecto inhibitorio del crecimiento de las bacterias. Aunque Pei *et. al.*, (2009) reportaron un CMB de 1.6 mg/mL para EHEC O157:H7 ATCC 43895, la CMB en nuestro estudio para todas las cepas fue menor (0.58 – 0.73 mg/mL), estas diferencias pueden deberse a variaciones en la fisiología de los aislamientos de serotipos, medios de cultivo y pureza de compuestos químicos.

La eficacia de citral se ha demostrado previamente contra diversas bacterias, incluidos varios patotipos de *E. coli* EHEC serotipo O157:H7, EAEC 042,) EAEC O104:H4 con CMB de 0.12 a 0.20, mg/mL). El aceite esencial contiene citral y otros terpenos (Iris *et. al.*, 2020) que causan daño y ruptura de la membrana celular bacteriana (Zhang *et. al.*, 2020).

El hexanal, un aldehído de C6 derivado de hojas verdes, es un componente del aroma de una gran cantidad de frutas, incluidas las manzanas con propiedades antimicrobianas y con inhibición de la fosfolipasa D, útil para la conservación de frutas y productos frescos después de la cosecha. Se ha informado que este compuesto está casi inactivo a *E. coli* (ATCC 10538) a una concentración de 500 µg/mL (Bisignano *et. al.*, 2001), en nuestro estudio con una CMB entre 2.24–2.52 mg/ml mostró un efecto antimicrobiano en las cepas analizadas. La actividad antimicrobiana podría deberse a la actividad de bloqueo de la superóxido dismutasa (SOD); sin embargo, sus efectos parecen depender de sus propiedades específicas en el sitio (volatilidad y liposolubilidad) y pueden

cambiar cuando las células están bajo estrés oxidativo (Matos *et. al.*, 2020). El hexanal fue el compuesto con la CMB más alta para las cepas de *E. coli* analizadas.

Las biopelículas son comunidades microbianas de superficie con propiedades distintas que tienen un tremendo impacto en la salud pública y la seguridad alimentaria (Vélez *et. al.*, 2019). Las biopelículas podrían estar constituidas por múltiples especies de microorganismos e interacciones complejas dentro de la comunidad que influyen en la arquitectura, la actividad y la resistencia a los antimicrobianos (Wang 2019). Vélez *et. al.*, (2019) demostraron que la exposición al hipoclorito (<5%) durante menos de 20 minutos indujo cambios en la biopelícula, como se observó en algunos casos en nuestro estudio el efecto de productos naturales solos o en combinación con HS suprimían la capacidad de formación de biopelículas en las cepas O26 y NPEC, así como en el resto de las cepas STEC no se indujo la formación de biopelícula, estos hallazgos son de interés para la industria y las autoridades sanitarias, dado que estos antimicrobianos podrían reducir los problemas de contaminación y las enfermedades relacionadas con estas bacterias. En otros estudios se han reportado que muchos antimicrobianos naturales inducen la formación de biopelículas (García-Heredia *et. al.*, 2016), lo que los hace inapropiados para su uso en el control de la contaminación microbiana. Es importante elegir el antimicrobiano adecuado para reducir el riesgo de este factor de virulencia en industrias de alimentos, superficies, utensilios, material quirúrgico, catéteres, etc.

El efecto de los productos naturales en la movilidad se ha informado en cepas EHEC O157:H7, EAEH 042 y *E. coli* serotipo O104: H4, lo que demuestra que el extracto de carvacrol promovió la motilidad de dos de las cepas probadas (García-Heredia *et. al.*, 2016), el efecto es similar a la motilidad obtenida en el presente estudio, observando que en cepas STEC O26 tratadas con citral, eugenol, hexanal y calor choque promueven la motilidad, el mismo fenómeno se observa en EHEC O157:H7 con los compuestos eugenol y hexanal. La promoción del swarming en nuestro estudio puede estar relacionada con la resistencia a los antibióticos que presentan las bacterias, como se ha demostrado en estudios anteriores donde observaron cuántas variantes influyen en cómo los antibióticos afectan la natación y la motilidad del swarming en *S. Typhimurium* MDR, incluido el tipo de antibiótico, su concentración, gen de resistencia a antibióticos y factores de aislamiento específicos. Identificar estos factores de aislamiento específicos y cómo interactúan será

importante para comprender mejor cómo los antibióticos influyen en la motilidad (Brunelle *et. al.*, 2017).

Aunque los productos naturales redujeron la expresión de la formación de biopelículas, no tuvieron un efecto importante en la expresión de los genes *csgA* y *csgD* que están relacionados con la regulación de fimbria, curli y biopelícula respectivamente. Su expresión aumentó cuando los compuestos se combinaron con choque térmico, pero ninguno aumentó la biopelícula. Los genes relacionados con el choque térmico se comportan de manera diferente bajo la exposición de *E. coli* a los tratamientos. El gen *rpoE* está involucrado en la respuesta al estrés específicamente a nivel de membrana, su expresión aumentó por la exposición a todos los tratamientos, por otro lado, la expresión de *rpoH* permaneció sin cambios y *rpoS* permaneció sin cambios solo con los compuestos químicos, pero el choque térmico solo o combinado con compuestos (excepto con citral) aumentaron su expresión.

La toxina Shiga se considera un factor de virulencia de STEC muy importante, Yang *et. al.*, (2018) cuando se trató *E. coli* O157: H7 con galato de epigallocatequina y ácido cítrico, se observó una disminución de la expresión del gen *stx1*. En nuestro estudio, la mayoría de los tratamientos que no produjeron cambios significativos se observaron por efecto de productos naturales solos o en combinación con HS; con excepción del tratamiento con eugenol, donde se detectó una reducción de expresión de este gen. Kim *et. al.*, (2015) informaron que el tratamiento con aceite de corteza de canela reduce la expresión del gen *stx* en EHEC, el efecto observado con este aceite esencial podría atribuirse al eugenol.

En general, las bacterias exhiben swarming en movimientos más largos y velocidades más altas que las bacterias que nadan individualmente en un medio líquido. El swarming se ve facilitado por varias alteraciones, como el aumento del número de flagelos, las proteínas especiales del estator o los tensoactivos secretados, y está asociado con la resistencia a los antimicrobianos (Partridge *et. al.*, 2019).

El efecto inhibitorio de varios aceites esenciales como el carvacrol sobre la movilidad swarming se ha informado en cepas de *E. coli* (serotipos O157: H7, 042 y O104: H4), (García-Heredia *et al.*, 2016). En nuestro estudio, este efecto inhibitorio se observó principalmente en la cepa NPEC en la mayoría de los tratamientos estudiados, sin

embargo, la mayoría de los tratamientos aplicados a las cepas patógenas provocó la estimulación de la movilidad swarming. Se ha observado la promoción de la movilidad swarming por los antibióticos en *S. Typhimurium* multirresistente, lo que indica que muchos factores pueden modificar los patrones de motilidad, como el tipo de antibiótico, la concentración de antibióticos, la resistencia a los antibióticos, los genes presentes y factores de aislamiento específicos. Identificar estos factores puede ayudar a comprender cómo las bacterias pueden ser influenciadas por compuestos externos (Brunelle *et. al.*, 2017).

La expresión de genes durante la movilidad swarming exhibe diferentes comportamientos. *flhC* un gen relacionado con flagelos exhibe un comportamiento variable bajo la exposición de los compuestos; sin embargo, HS aumentó su expresión y también cuando se combinó con los compuestos. Además, otro gen relacionado con flagelos también exhibe una expresión variable bajo la exposición de compuestos, y HS lo sobreexpresa, aunque no cuando se combina con compuestos. El gen *rpoE* relacionado con el choque térmico se sobreexpresó por citral, eugenol con HS, cuando se combinaron citral y eugenol con HS, no se observó ningún efecto importante. Aunque, los compuestos y HS sobreexpresaron *rpoS*, cuando se combinaron se observó una baja expresión o ningún efecto. Fue interesante observar que HS solo, sobreexpresó todos los genes estudiados durante la formación de biopelícula y la movilidad. El tratamiento térmico es una intervención común para reducir el número de células vegetativas, sin embargo, algunas cepas de *E. coli* son extremadamente resistentes al calor, el calor induce a *E. coli* a actuar contra estas alteraciones, principalmente a través de las regulaciones genéticas de la respuesta al calor, incluidas las proteínas de choque térmico,  $\sigma E$  y  $\sigma S$ , para volver a plegar las proteínas mal plegadas y lograr el antagonismo al estrés por calor (Li y Gänzle, 2016), nuestros resultados muestran esta respuesta.

## CONCLUSIONES

1. Se demostró que la formación de biopelícula y la movilidad tipo swarming tienen una gran variabilidad entre las cepas STEC.
2. Se determinó que el eugenol, citral y hexanal mostraron actividad bactericida contra las cepas STEC en diferentes concentraciones.
3. El HS influye en la formación de biopelícula y movilidad tipo swarming, así como a los genes relacionados con biopelícula *csgA* y *csgD*, a movilidad swarming *flhC* y *flhD*, a los reguladores de choque térmico y tensiones en membrana *rpoH*, *rpoS*, *rpoE*, respectivamente, así como al gen *stx1* de las STEC.
4. Eugenol, citral y hexanal en concentraciones subletales permiten el crecimiento y modulación de factores de virulencia de las STEC.
5. La combinación de eugenol con HS, citral con HS y hexanal con HS tienen efecto en procesos fisiológicos relacionados con la formación de biopelícula y movilidad swarming de STEC.
6. Cuando se combinaron los productos naturales con HS se observó cómo afectaban al fenotipo en la formación de biopelícula y la movilidad de swarming, y el genotipo en la expresión de genes relacionados con factores de virulencia.
7. Se demostró que los genes de virulencia analizados son afectados por los compuestos naturales o el HS, pero no influyen significativamente en la formación de biopelícula y movilidad swarming.
8. Estos compuestos en sinergia con HS son candidatos para uso en la industria alimentaria como aditivos prometedores que ayuden en el control de bacterias patógenas relacionadas con los alimentos.

## PERSPECTIVAS

Sería interesante estudiar en el futuro compuestos naturales en alimentos que tienen tratamientos térmicos en su proceso y analizar el comportamiento de las bacterias y sus factores de virulencia, tanto fenotípicos como genotípicos.

También es importante hacer ensayos *in vivo* de estos tratamientos propuestos para evaluar, adherencia en células y toxicidad. Proponiendo hacer estos análisis tanto en líneas celulares como en alimentos poco procesados y/o con un proceso térmico o químico para su conservación. El hacer un análisis de cuantificación de la toxina Shiga con diferentes modelos, además de los genotipos, sería una complementación para este estudio pudiendo enriquecer el comportamiento de las STEC al estar produciendo la toxina Shiga en diferentes condiciones e incluso con diferentes modelos de análisis, ya que en este estudio el fenotipo no incluyó el estudio propio de la toxina Shiga.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de mycologie medicale*, 24(2), e51-e56.
- Abreu, A. C., McBain, A. J., & Simoes, M. (2012). Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural product reports*, 29(9), 1007-1021.
- Adator, E. H., Cheng, M., Holley, R., McAllister, T., & Narvaez-Bravo, C. (2018). Ability of Shiga toxigenic *Escherichia coli* to survive within dry-surface biofilms and transfer to fresh lettuce. *International journal of food microbiology*, 269, 52-59.
- Aldridge, P., & Hughes, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Current opinion in microbiology*, 5(2), 160-165.
- Allison, S. E., Silphaduang, U., Mascarenhas, M., Konczy, P., Quan, Q., Karmali, M., & Coombes, B. K. (2012). Novel repressor of *Escherichia coli* O157: H7 motility encoded in the putative fimbrial cluster OI-1. *Journal of bacteriology*, 194(19), 5343-5352.
- Almanza, A. V. (2011). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products. *Federal Register*, 77, 9.
- Ayyildiz, D., Arga, K. Y., Avci, F. G., Altinisik, F. E., Gurer, C., Toplan, G. G., Kaza, D., Wozny, K., Brügger, B., Mertoglu, B., & Akbulut, B. S. (2017). Transcriptomic analysis displays the effect of (-)-roemerine on the motility and nutrient uptake in *Escherichia coli*. *Current genetics*, 63(4), 709-722.
- Be'er, A., & Ariel, G. (2019). A statistical physics view of swarming bacteria. *Movement ecology*, 7(1), 1-17.

Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. In *Bacterial biofilms* (pp. 249-289). Springer, Berlin, Heidelberg.

Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J., A., J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., & Ghigo, J. M. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular microbiology*, *51*(3), 659-674.

Berg, H. C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annual review of biochemistry*, *72*.

Biscola, F. T., Abe, C. M., & Guth, B. E. C. (2011). Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(7), 2201-2208.

Bisignano, G., Laganà, M. G., Trombetta, D., Arena, S., Nostro, A., Uccella, N., Mazzanti, G., & Saija, A. (2001). In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS microbiology letters*, *198*(1), 9-13.

Blair, D. F. (2003). Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS letters*, *545*(1), 86-95.

Bohne, J., Sokolovic, Z., & Goebel, W. (1994). Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*, *11*(6), 1141-1150.

Brooks, J. T., Sowers, E. G., Wells, J. G., Greene, K. D., Griffin, P. M., Hoekstra, R. M., & Strockbine, N. A. (2005). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *The Journal of infectious diseases*, *192*(8), 1422-1429.

Brown, J., Faulds-Pain, A., & Aldridge, P. (2009). Pili and Flagella: Current Research and Future Trends.

Brunelle, B. W., Bearson, B. L., Bearson, S. M., & Casey, T. A. (2017). Multidrug-resistant *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolates are resistant to antibiotics that influence their swimming and swarming motility. *mSphere*, 2(6), e00306-17.

Bullwinkle, T. J., Reynolds, N. M., Raina, M., Moghal, A., Matsa, E., Rajkovic, A., Kayadibi, H., Fazlollahi, F., Ryan, C., Howitz, Nathaniel, H., Faull, K. F., Lazazzera, B., A., & Ibba, M. (2014). Oxidation of cellular amino acid pools leads to cytotoxic mistranslation of the genetic code. *Elife*, 3, e02501.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W., & Brandl, M. T. (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157: H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food microbiology*, 57, 81-89.

Carvalhais, V., Delgado-Rastrollo, M., Melo, L. D., & Cerca, N. (2013). Controlled RNA contamination and degradation and its impact on qPCR gene expression in *S. epidermidis* biofilms. *Journal of microbiological methods*, 95(2), 195-200.

Carey, C. M., Kostrzynska, M., Ojha, S., & Thompson, S. (2008). The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of microbiological methods*, 73(2), 125-132.

Castillo, S., Heredia, N., Arechiga-Carvajal, E., & García, S. (2014). Citrus extracts as inhibitors of quorum sensing, biofilm formation and motility of *Campylobacter jejuni*. *Food biotechnology*, 28(2), 106-122.

Chen, C., Liao, X., Jiang, H., Zhu, H., Yue, L., Li, S., B., Fang & Liu, Y. (2010). Characteristics of *Escherichia coli* biofilm production, genetic typing, drug resistance pattern and gene expression under aminoglycoside pressures. *Environmental toxicology and pharmacology*, 30(1), 5-10.

Chen, D., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2015). Control of pathogens in biofilms on the surface of stainless steel by levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate. *International journal of food microbiology*, 207, 1-7.

Chilcott, G. S., & Hughes, K. T. (2000). Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 694-708.

Culler, H. F., Mota, C. M., Abe, C. M., Elias, W. P., Sircili, M. P., & Franzolin, M. R. (2014). Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. *BioMed research international*, 2014.

Danese, P. N., Pratt, L. A., & Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of bacteriology*, 182(12), 3593-3596.

Da Silva, F. F. M., Monte, F. J. Q., de Lemos, T. L. G., Do Nascimento, P. G. G., de Medeiros Costa, A. K., & De Paiva, L. M. M. (2018). Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1-9.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*, 2(2), 114-122.

De Carvalho, C. C. (2018). Marine biofilms: a successful microbial strategy with economic implications. *Frontiers in Marine Science*, 5, 126.

Del Pozo, J. L., & Patel, R. (2007). The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(2), 204-209.

Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of ethnopharmacology*, 130(1), 107-115.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.

Dowd, S. E. (2007). *Escherichia coli* O157: H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. *FEMS microbiology letters*, 273(2), 214-223.

Dudley, E. G., Abe, C., Ghigo, J. M., Latour-Lambert, P., Hormazabal, J. C., & Nataro, J. P. (2006). An IncI1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infection and immunity*, 74(4), 2102-2114.

Doyle, T. B., Hawkins, A. C., & McCarter, L. L. (2004). The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 186(19), 6341-6350.

Duncan, M. J., Mann, E. L., Cohen, M. S., Ofek, I., Sharon, N., & Abraham, S. N. (2005). The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37707-37716.

Etcheverria, A. I., & Padola, N. L. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence*, 4(5), 366-372.

Evans, C. R., Fan, Y., & Ling, J. (2019). Increased mistranslation protects *E. coli* from protein misfolding stress due to activation of a RpoS-dependent heat shock response. *Febs Letters*, 593(22), 3220-3227.

Fan, Y., Wu, J., Ung, M. H., De Lay, N., Cheng, C., & Ling, J. (2015). Protein mistranslation protects bacteria against oxidative stress. *Nucleic acids research*, 43(3), 1740-1748.

Filgueiras, C. T., & Vanetti, M. C. D. (2006). Effect of eugenol on growth and listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. *Brazilian archives of biology and technology*, 49(3), 405-409.

Foster, J. W., Storz, G., & Hengge-Aronis, R. (2000). Bacterial stress responses. *Microbial responses to acid stress*, 99-115.

Fouladkhah, A., Geornaras, I., & Sofos, J. N. (2013). Biofilm Formation of O157 and Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Multidrug-Resistant and Susceptible *Salmonella* Typhimurium and Newport and Their Inactivation by Sanitizers. *Journal of food science*, 78(6), M880-M886.

Fredriksson, Å., Ballesteros, M., Peterson, C. N., Persson, Ö., Silhavy, T. J., & Nyström, T. (2007). Decline in ribosomal fidelity contributes to the accumulation and stabilization of the master stress response regulator  $\sigma$ S upon carbon starvation. *Genes & development*, 21(7), 862-874.

García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J. Á., Feng, P., & Heredia, N. (2016). Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food microbiology*, 59, 124-132.

Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412(6845), 442-445.

Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology*, 108(1), 1-9.

Guisbert, E., Herman, C., Lu, C. Z., & Gross, C. A. (2004). A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes & development*, 18(22), 2812-2821.

Guisbert, E., Yura, T., Rhodius, V. A., & Gross, C. A. (2008). Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 545-554.

Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 825.

Hadjifrangiskou, M., Kostakioti, M., Chen, S. L., Henderson, J. P., Greene, S. E., & Hultgren, S. J. (2011). A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 80(6), 1516-1529.

Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2(4), 1242-1267.

Hase, Y., Tarusawa, T., Muto, A., & Himeno, H. (2013). Impairment of ribosome maturation or function confers salt resistance on *Escherichia coli* cells. *PloS one*, 8(5).

Hedican, E. B., Medus, C., Besser, J. M., Juni, B. A., Koziol, B., Taylor, C., & Smith, K. E. (2009). Characteristics of O157 versus non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Minnesota, 2000–2006. *Clinical Infectious Diseases*, 49(3), 358-364.

Hengge-Aronis, R. (2002). Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter  $\sigma^S$ -selective. *Current opinion in microbiology*, 5(6), 591-595.

Hill, L. E., Gomes, C., & Taylor, T. M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 86-93.

Iris, U., Elisabetta, M., Manca, M. L., Caddeo, C., Aroffu, M., Petretto, G. L., M., Manconi & José-Esteban, P. (2020). Comparison between citral and pompia essential oil loaded in phospholipid vesicles for the treatment of skin and mucosal infections.

Ito, A., Taniuchi, A., May, T., Kawata, K., & Okabe, S. (2009). Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 4093-4100.

Jarrell, K. F., & McBride, M. J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 466-476.

Jash, A., & Lim, L. T. (2018). Triggered release of hexanal from an imidazolidine precursor encapsulated in poly (lactic acid) and ethylcellulose carriers. *Journal of materials science*, 53(3), 2221-2235.

Javid, B., Sorrentino, F., Toosky, M., Zheng, W., Pinkham, J. T., Jain, N., Pan, M., Deighan, P., & Rubin, E. J. (2014). Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(3), 1132-1137.

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6303-6307.

Kakkanat, A., Phan, M. D., Lo, A. W., Beatson, S. A., & Schembri, M. A. (2017). Novel genes associated with enhanced motility of *Escherichia coli* ST131. *PLoS One*, *12*(5), e0176290.

Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27–30

Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M (2016) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* 44: D457–D462

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, *2*(2), 123-140.

Kaufman, T. S. (2015). The multiple faces of eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *26*(6), 1055-1085.

Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 1-16.

Kim, Y. G., Lee, J. H., Kim, S. I., Baek, K. H., & Lee, J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International journal of food microbiology*, *195*, 30–39.

Kim, Y. G., Lee, J. H., Gwon, G., Kim, S. I., Park, J. G., & Lee, J. (2016). Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific reports*, *6*(1), 1-11.

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular microbiology*, *48*(6), 1511-1524.

- Ko, M., & Park, C. (2000). H-NS-dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein. *Journal of bacteriology*, 182(16), 4670-4672.
- Komeda, Y. O. S. H. I. B. U. M. I. (1986). Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 168(3), 1315-1318.
- Kuchma, S. L., Delalez, N. J., Filkins, L. M., Snavely, E. A., Armitage, J. P., & O'Toole, G. A. (2015). Cyclic di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 requires the MotAB stator. *Journal of bacteriology*, 197(3), 420-430.
- Lee, Y. Y., Patellis, J., & Belas, R. (2013). Activity of *Proteus mirabilis* FliL is viscosity dependent and requires extragenic DNA. *Journal of bacteriology*, 195(4), 823-832.
- Lehti, T. A., Bauchart, P., Dobrindt, U., Korhonen, T. K., & Westerlund-Wikström, B. (2012). The fimbriae activator MatA switches off motility in *Escherichia coli* by repression of the flagellar master operon *flhDC*. *Microbiology*, 158(6), 1444-1455.
- Liao, J., Schurr, M. J., & Sauer, K. (2013). The MerR-like regulator BrlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology*, 195(15), 3352-3363.
- Li, H., & Gänzle, M. (2016). Some like it hot: heat resistance of *Escherichia coli* in food. *Frontiers in microbiology*, 7, 1763.
- Lim, E. S., Koo, O. K., Kim, M. J., & Kim, J. S. (2019). Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157: H7 biofilm and their synergistic effect with sodium hypochlorite. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Liu, Y., Wang, C., Fung, C., & Li, X. F. (2010). Quantification of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 by targeting the rpoS mRNA. *Analytical chemistry*, 82(7), 2612-2615.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods*, 25(4), 402-408.

Llor C, Bjerrum L (2014) Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf* 5(6):229–241

Macnab, R. M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 77-100.

Maeda, S., Ito, M., Ando, T., Ishimoto, Y., Fujisawa, Y., Takahashi, H., Matsuda, A., Sawamura, A., & Kato, S. (2006). Horizontal transfer of nonconjugative plasmids in a colony biofilm of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 255(1), 115-120.

Mak, K. K., Kamal, M., Ayuba, S., Sakirolla, R., Kang, Y. B., Mohandas, K., Balijepalli, M. K., Ahmad, S. H., & Pichika, M. (2019). A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: A transformation from ethnomedicine to industry. *Pharmacognosy Reviews*, 13(25), 1-9.

Maleki, F., Khosravi, A., Nasser, A., Taghinejad, H., & Azizian, M. (2016). Bacterial heat shock protein activity. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(3), BE01.

March Rossello, G. A., & Eiros Bouza, J. M. (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Medicina Clínica*, 141(8), 353-357.

Mathusa, E. C., Chen, Y., Enache, E., & Hontz, L. (2010). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Journal of food protection*, 73(9), 1721-1736.

Matos, D., Sá, C., Cardoso, P., Pires, A., & Figueira, E. (2020). *Rhizobium* sensing of airborne saturated aldehydes of different sizes modulates the response to Cd exposure. *Journal of Hazardous Materials*, 122629.

Minamino, T., & Imada, K. (2015). The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends in microbiology*, 23(5), 267-274.

Minamino, T., Imada, K., & Namba, K. (2008). Molecular motors of the bacterial flagella. *Current opinion in structural biology*, 18(6), 693-701.

Mittal, S., Sharma, M., & Chaudhary, U. (2015). Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens and global health*, 109(1), 26-29.

Model, P., Jovanovic, G., & Dworkin, J. (1997). The *Escherichia coli* phage-shock-protein (psp) operon. *Molecular microbiology*, 24(2), 255-261.

Mohler, K., & Ibba, M. (2017). Translational fidelity and mistranslation in the cellular response to stress. *Nature microbiology*, 2(9), 1-9.

Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current opinion in biotechnology*, 14(3), 255-261.

Montero, D. A., Velasco, J., Del Canto, F., Puente, J. L., Padola, N. L., Rasko, D. A., Farfán, M., Salazar, J., C., & Vidal, R. (2017). Locus of adhesion and autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

Morita, M. T., Tanaka, Y., Kodama, T. S., Kyogoku, Y., Yanagi, H., & Yura, T. (1999). Translational induction of heat shock transcription factor  $\zeta$ 32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes & development*, 13(6), 655-665.

Nakamura, S., & Minamino, T. (2019). Flagella-driven motility of bacteria. *Biomolecules*, 9(7), 279.

Nam, H., & Kim, M. M. (2013). Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. *Food and chemical toxicology*, 55, 106-112.

Naves, P., Del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodríguez-Cerrato, V., Ponte, M. C., & Soriano, F. (2008). Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of applied microbiology*, 105(2), 585-590.

Otter, J. A., Vickery, K., Walker, J. D., Pulcini, E. D., Stoodley, P., Goldenberg, S. D., Salkeld, J. A. G., Chewins, J., Yezli, J. D., & Edgeworth, J. D. (2015). Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *Journal of Hospital Infection*, 89(1), 16-27.

Page, A. V., & Liles, W. C. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections and the hemolytic-uremic syndrome. *Medical Clinics*, 97(4), 681-695.

Pan, T. (2013). Adaptive translation as a mechanism of stress response and adaptation. *Annual review of genetics*, 47.

Partridge, J. D., & Harshey, R. M. (2013). Swarming: flexible roaming plans. *Journal of bacteriology*, 195(5), 909-918.

Partridge, J. D., Nhu, N. T., Dufour, Y. S., & Harshey, R. M. (2019). *Escherichia coli* remodels the chemotaxis pathway for swarming. *MBio*, 10(2), e00316-19.

Patrick, J. E., & Kearns, D. B. (2012). Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Molecular microbiology*, 83(1), 14-23.

Patrignani, F., Iucci, L., Belletti, N., Gardini, F., Guerzoni, M. E., & Lanciotti, R. (2008). Effects of sub-lethal concentrations of hexanal and 2-(E)-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile compounds of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*,

*Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, 123(1-2), 1-8.

Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P., & Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of food science*, 74(7), M379-M383.

Petrova, O. E., Gupta, K., Liao, J., Goodwine, J. S., & Sauer, K. (2017). Divide and conquer: the *Pseudomonas aeruginosa* two-component hybrid S<sub>ag</sub>S<sub>enables</sub> biofilm formation and recalcitrance of biofilm cells to antimicrobial agents via distinct regulatory circuits. *Environmental microbiology*, 19(5), 2005-2024.

Piletti, R., Bugiereck, A. M., Pereira, A. T., Gussati, E., Dal Magro, J., Mello, J. M. M., Dalcanton, R., Z., Soares, C., Riella, H., G., & Fiori, M. A. (2017). Microencapsulation of eugenol molecules by  $\beta$ -cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 259-271.

Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*, 30(2), 285-293.

Pratt, L. A., & Kolter, R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current opinion in microbiology*, 2(6), 598-603.

Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., & Dorel, C. (2001). Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7213-7223.

Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P., & Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli*

strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental microbiology*, 2(4), 450-464.

Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., & Swerdlow, D. L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, united states, 1982–2002. *Emerging infectious diseases*, 11(4), 603.

Reisner, A., Haagensen, J. A., Schembri, M. A., Zechner, E. L., & Molin, S. (2003). Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular microbiology*, 48(4), 933-946.

Reisner, A., Höller, B. M., Molin, S., & Zechner, E. L. (2006). Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion. *Journal of bacteriology*, 188(10), 3582-3588.

Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 1-16.

Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A. C., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 2951-2963.

Schumann, W. (2016). Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress and Chaperones*, 21(6), 959-968.

Schumann, W. CIRCE, HAIR and ROSE: Regulation of the Bacterial Heat Shock Response. *STRESS BIOLOGY*, 3.

Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1-10.

Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of applied microbiology*, 121(2), 309-319.

Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D., & Nataro, J. P. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 41(5), 983-997.

Sheng, L., Olsen, S. A., Hu, J., Yue, W., Means, W. J., & Zhu, M. J. (2016). Inhibitory effects of grape seed extract on growth, quorum sensing, and virulence factors of CDC “top-six” non-O157 Shiga toxin producing *E. coli*. *International journal of food microbiology*, 229, 24-32.

Shi, C., Song, K., Zhang, X., Sun, Y., Sui, Y., Chen, Y., Jia, Z., Sun, H., & Xia, X. (2016). Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS One*, 11(7), e0159006.

Shi, C., Sun, Y., Liu, Z., Guo, D., Sun, H., Sun, Z., Chen, S., Zhang, W., Wen, Q., Peng, X., & Xia, X. (2017). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* virulence factors by citral. *Scientific reports*, 7, 43243.

Simpson Beauchamp, C., Dourou, D., Geornaras, I., Yoon, Y., Scanga, J. A., Belk, K. E., Smith, G. C., Nychas, G-J. E., & Sofos, J. N. (2012). Transfer, Attachment, and Formation of Biofilms by *Escherichia coli* O157: H7 on Meat-Contact Surface Materials. *Journal of food science*, 77(6), M343-M347.

Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The open microbiology journal*, 11, 53.

Smith, T. G., & Hoover, T. R. (2009). Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. *Advances in applied microbiology*, 67, 257-295.

Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mackey, B., & Pagán, R. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 1928-1939.

Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., & Bertin, P. (1999). Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *Journal of bacteriology*, 181(24), 7500-7508.

Sperandio, V., Torres, A. G., & Kaper, J. B. (2002). Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Molecular microbiology*, 43(3), 809-821.

Straus, D. B., Walter, W. A., & Gross, C. A. (1987). The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of  $\sigma_{32}$ . *Nature*, 329(6137), 348-351.

Street, T. O., Zeng, X., Pellarin, R., Bonomi, M., Sali, A., Kelly, M. J., Chu, F., & Agard, D. A. (2014). Elucidating the mechanism of substrate recognition by the bacterial Hsp90 molecular chaperone. *Journal of molecular biology*, 426(12), 2393-2404.

Sturbelle, R. T., de Avila, L. F. D. C., Roos, T. B., Borchardt, J. L., Dellagostin, O. A., & Leite, F. P. L. (2015). The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. *Veterinary microbiology*, 180(3-4), 245-252.

Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., & Hameed, S. (2014). Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2014.

Teh, K. H., Flint, S., & French, N. (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. *International journal of food microbiology*, 143(3), 118-124.

Terashima, H., Kawamoto, A., Morimoto, Y. V., Imada, K., & Minamino, T. (2017). Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. *Biophysics and Physicobiology*, 14, 191-198.

Toutain, C. M., Zegans, M. E., & O'Toole, G. A. (2005). Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 187(2), 771-777.

Tozzoli, R., Grande, L., Michelacci, V., Ranieri, P., Maugliani, A., Caprioli, A., & Morabito, S. (2014). Shiga toxin-converting phages and the emergence of new pathogenic *Escherichia coli*: a world in motion. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 80.

Turner, L., Zhang, R., Darnton, N. C., & Berg, H. C. (2010). Visualization of flagella during bacterial swarming. *Journal of bacteriology*, 192(13), 3259-3267.

Uhlich, G. A., Cooke, P. H., & Solomon, E. B. (2006). Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157: H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and environmental microbiology*, 72(4), 2564-2572.

Velez, M. V., Cáceres, M. E., Colello, R., Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2019). Influence of sodium hypochlorite on STEC biofilm formation.

Wang, R. (2019). Biofilms and meat safety: a mini review. *Journal of food protection*, 82(1), 120-127.

Wang, R., Bono, J. L., Kalchayanand, N., Shackelford, S., & Harhay, D. M. (2012). Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. *Journal of food protection*, 75(8), 1418-1428.

WHO/FAO. 2018. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization and monitoring. Microbiological Risk Assessment Series 31, Report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wink, M., & Schimmer, O. (2010). Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. In functions and biotechnology of plant secondary metabolites.

Woranuch, S., & Yoksan, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), 578-585.

Wuertz, S., Okabe, S., & Hausner, M. (2004). Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. *Water Science and Technology*, 49(11-12), 327-336.

Yadav, M. K., Chae, S. W., Im, G. J., Chung, J. W., & Song, J. J. (2015). Eugenol: a phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. *PLoS One*, 10(3).

Yang, J., Tang, C. B., Xiao, J., Du, W. F., & Li, R. (2018). Influences of epigallocatechin gallate and citric acid on *Escherichia coli* O157: H7 toxin gene expression and virulence-associated stress response. *Letters in applied microbiology*, 67(5), 435-441.

Xiangning, B., Zhang, J., Anoop, A., Cecilia, J., Ralf, E., Flemming, S., Xiong, Y., & Andreas, M. (2019). Molecular Characterization and Comparative Genomics of Clinical Hybrid Shiga Toxin-Producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains in Sweden. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 9(1).

Zhang, Y., Wei, J., Chen, H., Song, Z., Guo, H., Yuan, Y., & Yue, T. (2020). Antibacterial activity of essential oils against *Stenotrophomonas maltophilia* and the effect of citral on cell membrane. *LWT*, 117, 108667.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Cindy Joanna Caballero Prado

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con orientación en Microbiología

Tesis: INFLUENCIA DE PRODUCTOS NATURALES Y TEMPERATURA SOBRE LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA EN *Escherichia coli* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA

Campo de Estudio: Fisiología microbiana y productos naturales

Datos Personales: Nacida en Morelia, Michoacán el 2 de marzo de 1985, hija de Elías Caballero Ayala y María Yolanda Prado Andrade.

Educación: Egresada de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, grado obtenido Químico Farmacobiólogo en 2010. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestro en Ciencias con acentuación en Microbiología en 2012.

Experiencia Profesional: Maestra en nivel superior de la Universidad de Monterrey desde 2015, profesora de nivel medio superior en la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2016.