

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**Determinación del efecto inhibitor del aceite esencial
Oreganum compactum sobre bacterias alterantes de
productos refrigerados.**

TRABAJO FIN DE GRADO
Diciembre-2015

Autor: Guadalupe Domingo Doménech

Tutor/es: Esther Sendra Nadal



Determinación del efecto inhibidor del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre bacterias alterantes de productos refrigerados.

RESUMEN:

Estudio de la valoración del efectos antimicrobianos del aceite esencial del orégano (*Oreganum compactum*) de las siguientes bacterias, todas ellas alterantes típicas de alimentos refrigerados o indicadores de la presencia de patógenos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Serratia marcescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Achoromobacter denitrificans*, *Leuconostoc carnosum*, *Listeria innocua*, *Alcaligenes fecales*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterococcus faecales*. Los ensayos se realizaron mediante pruebas de inhibición en disco y por el métodos de la concentración mínima inhibitoria en medios Mueller- Hinton (MH) caldo, leche entera (LE) con un 3.6% de materia grasa y leche desnatada (LD) con un 0,3% de materias grasa. Para la valoración de la actividad antimicrobiana mediante difusión en disco se evaluaron volúmenes de aceite de de 40, 20, 10, 5,2.5, 0 μ l, y para las pruebas de microdilución (MIC) en concentraciones de entre 20 microlitros por mL hasta 0,009 microlitros por mL.

Palabras clave

AE, antimicrobiano, MIC, *Oreganum compactum*, bacterias.

Determination of the inhibitory effect of essential oil on spoilage bacteria *Oreganum compactum* refrigerated product.

ABSTRACT

Assessment study antimicrobial effects of essential oil of oregano (*Oreganum compactum*) of the following bacteria, all refrigerated food typical alternating or indicators of the presence of pathogens: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Serratia marcescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Achromobacter denitrificans*, *Leuconostoc carnosum*, *Listeria innocua*, *Alcaligenes faecales*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterococcus faecales* by trials disk inhibition tests and the methods of the minimum inhibitory concentration in media Mueller Hinton (MH) broth, whole milk (LE) with a 3.6% fat and skim milk (LD) were performed with a 0,3% fat materials. For the evaluation of the antimicrobial activity by disk diffusion oil volumes of 40, 20, 10, 5, 2.5, 0 μ l were evaluated, and microdilution testing (MIC) in concentrations of 20 microliters per mL to 0.009 microliters per mL.

Keywords

AE, antimicrobial, MIC, *Oreganum compactum* bacteria.



GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

REFERENCIAS DEL TRABAJO FINAL DE GRADO

Título: Determinación del efecto inhibitor del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre bacterias alterantes de productos refrigerados.

Modalidad (proyecto/experimental/bibliográfico/caso práctico): Experimental

Autor: Guadalupe Domingo Doménech

Director/es: Esther Sendra Nadal

Convocatoria: 2015

Número de referencias bibliográficas: 24

Número de tablas: 21

Número de figuras: 46

Palabras clave

Achromobacter denitrificans, AE, *Alcaligenes fecales*, antimicrobiano, *Enterococcus faecales*, *Escherichia coli*, *Leuconostoc carnosum*, *Listeria innocua*, microdilución, MIC, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Serratia marcescens*, *Shewanella putrefaciens*.



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Los aceites esenciales como conservantes naturales	14
1.2 Actividad antioxidante.....	16
1.3 Composición química.....	16
1.4 Aceite esencial de <i>Oreganum compactum</i>	16
1.5 El deterioro de los alimentos debido a los microorganismos.	17
1.6 Características de las bacterias estudiadas.....	17
1.6.1 <i>Serratia marcescens</i> (854).....	18
1.6.2 <i>Pseudomonas fragi</i> (446T).....	19
1.6.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i> (378).....	19
1.6.4 <i>Shewanella putrefaciens</i> (5346T).....	20
1.6.5 <i>Achromobacter denitrificans</i> (449).....	20
1.6.6 <i>Listeria innocua</i> (910).....	21
1.6.7 <i>Leuconostoc carnosum</i> (4024T).....	21
1.6.8 <i>Escherichia coli</i> (101).....	22
1.6.9 <i>Alcaligenes faecalis</i> (145).....	23
1.6.10 <i>Enterococcus faecalis</i> (184).....	23
2. OBJETIVOS	24
2.1 objetivos principales	24
2.2 objetivos específicos.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Aceite esencial.....	25
3.1.1 Composición química del aceite esencial.....	25
3.2 Medio de cultivo.....	27
3.3 Cepas estudiadas.....	28
3.3.1 Recuperación de las cepas de estudio.....	28
3.4 Ensayos de actividad antimicrobiana mediante pruebas de difusión en disco. 29	
3.5 Determinación de la MIC.....	31

3.6	Tercer ensayo: Comprobación de los resultados MIC mediante siembra por estría.	32
3.7	Análisis estadístico	33
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1	Actividad antimicrobiana determinada por prueba de difusión en disco.	34
4.2	Actividad antimicrobiana en medio líquido	47
4.3	MIC en placas.....	56
	Mueller-Hinton 26°C	56
	<i>Pseudomonas fragi</i>	57
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	57
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	58
	Leche desnatada 26°C.....	58
	<i>Leeuconostoc carnosum</i>	59
	<i>Pseudomonas fragi</i>	59
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	60
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	60
	Leche entera 26°C.....	61
	<i>Pseudomonas fragi</i>	61
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	62
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	62
5.	CONCLUSIONES	65
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del aceite esencial de <i>Oreganum compactum</i> determinado por cromatografía gaseosa. Fuente: Parra, 2014.....	25
Tabla 2. Composición nutricional de la leche entera.....	27
Tabla 3. Composición nutricional de la leche desnatada.....	27
Tabla 4. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Serratia marcescens</i> CECT 854. (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).....	34
Tabla 5. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Pseudomonas fragi</i> CECT 446T (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).....	35
Tabla 6. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT 378 (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).).....	37
Tabla 7. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Shewanella putrefaciens</i> CECT 5346T (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).....	38
Tabla 8. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Alcaligenes faecalis</i> CECT 145 (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).	39
Tabla 9. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Listeria innocua</i> CECT 910. (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).	40
Tabla 10. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Escherichia coli</i> CECT 101 (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).	42

Tabla 11. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Achromobacter denitrificans</i> CECT 449 (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).	43
Tabla 12. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Leuconostoc carnosum</i> 4024T (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).	45
Tabla 13. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial <i>Oreganum compactum</i> sobre <i>Enterococcus faecalis</i> CECT 145 (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).	46
Tabla 14. Resumen MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , en medio Mueller-Hinton a con el colorante a 37°C durante 48 horas.	47
Tabla 15. Resumen MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Achromobacter denitrificans</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> en medio Mueller-Hinton a con el colorante a 37°C durante 48 horas.	49
Tabla 16. Resumen MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , en medio leche desnatada.....	50
Tabla 17. Resumen MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Achromobacter denitrificans</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> en leche desnatada.....	52
Tabla 18. Resumen MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , en medio leche entera.....	53
Tabla 19. Resumen MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Achromobacter denitrificans</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> en leche entera.....	54
Tabla 20. Cuadro resumen para bacterias de 26°C.....	63
Tabla 21. Cuadro resumen para bacterias de 37°C.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Medio de cultivo junto con los tubos y puntas de micropipeta.....	28
Figura 2. : Cepas en incubación a 26°C.....	29
Figura 3. : Cepas en incubación a 37°C.....	29
Figura 4. : Material del ensayo de difusión en disco.....	30
Figura 5. Incubación en disco en estufa a 26°C.....	30
Figura 6. Incubación en disco en estufa a 37°C.	30
Figura 7. Lectura del diámetro del halo de <i>Serratia marcescens</i>	30
Figura 8. Preparación del material para la prueba MIC.....	32
Figura 9. <i>Serratia marcescens</i> con una cantidad de 40 µl de AE.....	35
Figura 10. <i>Pseudomonas fragi</i> con una cantidad de 2,5 µl del AE.....	36
Figura 11. <i>Pseudomonas fragi</i> con una cantidad de 10 µl del AE.....	36
Figura 12. <i>Pseudomonas fragi</i> con una cantidad de 20 µl del AE.....	36
Figura 13. <i>Pseudomonas fluorescens</i> con una cantidad de 40 µl del AE.....	37
Figura 14. <i>Pseudomonas fluorescens</i> con una cantidad de 20 µl del AE.....	37
Figura 15. <i>Pseudomonas fluorescens</i> con una cantidad de 10 µl del AE.....	38
Figura 16. <i>Pseudomonas fluorescens</i> con una cantidad de 5 µl del AE.....	38
Figura 17. <i>Shewanella putrefaciens</i> con una cantidad de 40 µl de AE.....	39
Figura 18. <i>Alcaligenes faecalis</i> con una cantidad de 40 µl del AE.	40
Figura 19. <i>Listeria innocua</i> con una cantidad de 40 µl del AE.....	41
Figura 20. <i>Escherichia coli</i> con una cantidad de 2,5 µl del AE.....	42
Figura 21. <i>Escherichia coli</i> con una cantidad de 40 µl del AE.....	43
Figura 22. <i>Escherichia coli</i> con una cantidad de 10 µl del AE.....	43
Figura 23. <i>Achromobacter denitrificans</i> con una cantidad de 5 µl del AE.....	44
Figura 24. <i>Achromobacter denitrificans</i> con una cantidad de 10µl del AE.....	44
Figura 25. <i>Achromobacter denitrificans</i> con una cantidad de 20 µl del AE.....	44

Figura 26. <i>Leuconostoc Carnosum</i> con una cantidad de 40µl del AE.....	45
Figura 27. MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Serratia marcenscens</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , en medio Mueller-Hinton a con el colorante a 37°C durante 48 horas.....	47
Figura 28. MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Listeria innocua</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Achromobacter denitrificans</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> en medio Mueller-Hinton a con el colorante a 37°C durante 48 horas.....	49
Figura 29. MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Serratia marcenscens</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , en medio leche desnatada con el colorante a 37°C durante 48 horas.....	50
Figura 30. MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Achromobacter denitrificans</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> en leche desnatada con el colorante a 37°C durante 48 horas.....	52
Figura 31. MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Serratia marcenscens</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , en medio leche entera con colorante a 37°C durante 48 horas.....	53
Figura 32. MIC del AE <i>Oreganum compactum</i> observado para <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Achromobacter denitrificans</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> en leche entera con el colorante a 37°C durante 48 horas.....	54
Figura 33. <i>Serratia marcenscens</i> en medio Mueller-Hinton a 26°C.....	56
Figura 34. <i>Leuconostoc carnosum</i> en medio Mueller-Hinton a 26°C	56
Figura 35. <i>Pseudomonas fragi</i> en medio Mueller-Hinton a 26°C.....	57
Figura 36. <i>Pseudomonas fluorescens</i> en medio Mueller-Hinton a 26°C.....	57
Figura 37. <i>Shewanella putrefaciens</i> en medio Mueller-Hinton a 26°C.....	58
Figura 38. <i>Shewanella putrefaciens</i> en leche desnatada a 26°C.....	58
Figura 39 <i>Leuconostoc carnosum</i> en leche desnatada a 26°C.....	59
Figura 40 <i>Pseudomonas fragi</i> en leche desnatada. 26°C.....	59
Figura 41. <i>Pseudomonas fluorescens</i> en leche desnatada a 26°C.....	60
Figura 42. <i>Shewanella putrefaciens</i> en leche desnatada a 26°C	60
Figura 43. <i>Serratia marcenscens</i> en leche entera a 26°C.....	61
Figura 44. <i>Pseudomonas fragi</i> en leche entera a 26°C.	61

Figura 45. *Pseudomonas fluorescens* en leche entera a 26°C.....62

Figura 46. *Shewanella putrefaciens* en leche entera a 26°C.....63



1. INTRODUCCIÓN

La degradación de los alimentos se puede producir básicamente por dos medios, la oxidación de los lípidos y el crecimiento de microorganismos (Viuda-Martos *et al.*, 2011). Ambos están relacionados ya que la presencia de microorganismos puede acelerar la oxidación lipídica y otros procesos de deterioro, produciendo modificaciones en las propiedades organolépticas de los alimentos (Saggiorato *et al.*, 2012). Es por ello que la industria alimentaria utiliza aditivos para retardar o inhibir los procesos de degradación aumentando así la vida útil del producto, pero en la actualidad se ha demostrado que los compuestos sintéticos pueden causar daño en el ADN y producir carcinogénesis (Politeo *et al.*, 2007).

Es por ello que ha crecido el interés en la investigación de productos naturales con compuestos activos antimicrobianos sin efecto negativo en la salud humana, como son los aceites esenciales (Delamare *et al.*, 2007).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles presentes en diversas plantas aromáticas, los cuales son extraídos de diferentes partes de la planta como son hojas, tallos, raíces, flores y cáscaras de frutos; utilizando varias técnicas como son la extracción por disolvente, prensado en frío o por extracción de fluido supercrítico siendo la principal forma de obtención por el método de destilación de vapor.

En nuestro caso, el aceite utilizado es el *Oreganum compactum*, su componente principal es el timol presente en un 27%.

1.1 Los aceites esenciales como conservantes naturales

Los aceites vegetales se utilizan comúnmente como saborizante de alimentos (Teixeira *et al.*, 2013), debido a que sus compuestos volátiles mejoran las características organolépticas del este.

Los árabes en la edad media ya los utilizaban como conservantes por sus propiedades antisépticas, en la actualidad esta tendencia no ha cambiado mucho excepto que ahora se conocen sus mecanismos de acción. En la naturaleza los aceites esenciales ya tienen el papel de proteger a las plantas como antimicrobiano y también reducir el apetito en herbívoros con un sabor desagradable. También pueden atraer algunos insectos que favorecen la dispersión del polen y semillas o repeler otros indeseables.

En general son líquidos, volátiles, solubles en lípidos y disolventes orgánicos con una densidad más baja que el agua (Bakkali *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales están compuestos por una mezcla de sustancias con diferente composición química con bajo peso molecular, las cuales se conocen por sus propiedades antibacterianas que puede ser sustitutivo del tradicional papel de los aditivos (Delamare *et al.*, 2007) los cuales están ganando su interés dentro de las industrias alimentarias por

ser reconocidos como seguros (GRAS) y es por ello por lo que son aceptados por los consumidores (Burt *et al.*, 2004).

Pero esta propiedad no es determinada en todas las plantas ni incluso en una misma especie, sino que es mucho más complejo, ya que no solo depende de la composición química sino también de las condiciones ambientales y agronómicas (Carovic-Stanko *et al.*, 2010). Además, no depende de un componente en concreto sino de la combinación de los principales metabolitos que sintetiza la planta en respuesta de amenazas (Raut *et al.*, 2014).

También el secado y el almacenamiento poscosecha afecta a la composición química e incluso el método de extracción determinan tanto el rendimiento como la composición de los componentes de un aceite esencial, y por lo tanto, decide sus propiedades biológicas (Hussain *et al.*, 2008).

Existen diferentes métodos de extracción de aceites esenciales que se utilizan dependiendo de la finalidad de este, pueden incluir el uso de dióxido de carbono supercrítico o la destilación al vapor, o la extracción de disolventes lipófilos. Cada uno de ellos ofrece la obtención de un perfil diferente del aceite esencial, no solo en el número de moléculas sino también en el tipo estequiométrico de las moléculas extraídas (F. Bakkali *et al.*, 2008).

Por ejemplo, podemos encontrar aceite esencial en diferentes partes de la planta como pueden ser las flores, hojas, raíces y frutas con diferentes propiedades biológica y extraer un grupo de compuesto diferentes según la polaridad del disolvente utilizado (Cowan *et al.*, 1999).

El principal modo de acción de los metabolitos del aceite esencial es la desestabilización de la membrana. Los aceites esenciales son de naturaleza lipófila, lo que significa que su permeabilidad a través de la pared y membrana celular es fácil. Las interacciones entre los metabolitos y los componentes de la membrana como son los polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos hace aún más permeable la membrana, dando lugar a fugas de radicales, citocromo C, iones de calcio y proteínas, conduciendo a la muerte celular por apoptosis y necrosis (Saad *et al.*, 2013).

Además tanto el colapso en la actividad de la bomba de protones como la reducción del potencial de la membrana permite la fuga de componentes del interior de la célula provocando una pérdida de la viabilidad (Di Pasqua *et al.*, 2007).

También se pueden producir más mecanismos de acción como la desnaturalización de las proteínas citoplasmáticas o la inactivación de las enzimas, todas ello acabando con la muerte de la bacteria (Burt, 2004).

A todo ello hay que añadir las reacciones en cadena de la pared celular, que provocan invasiones a través del interior del conjunto de la célula alterando las estructuras internas de la célula (Barbehenn *et al.*, 2005).

1.2 Actividad antioxidante

Los aceites esenciales contienen terpenoides y componentes fenólicos los cuales tienen poder antioxidantes. La capacidad antioxidante en eucariotas viene dada por la producción de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno que reaccionan con el hierro generando radical hidroxilo como reactivo intermedio, el cual es altamente perjudicial para el ADN mitocondrial.

Este daño inhibe la expresión de electrones en el transporte de proteínas, lo que conduce a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Van Houten *et al.*, 2006). Las cuales son un grupo de moléculas altamente reactivas que incluyen radicales libres como puede ser el ion superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH), además de radicales no libres como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Por otra parte, las especies ROS también pueden causar la peroxidación de lípidos en alimentos durante el procesado y almacenamiento, lo que tiene como consecuencia una pérdida de la calidad de los alimentos y una disminución de la vida útil del mismo (Mau *et al.*, 2004).

Los antioxidantes son capaces de prevenir o retrasar este proceso oxidativo mediante la inhibición en el inicio o propagación de la cadena oxidativa, y de esa forma aumentar la calidad y la vida útil del producto.

Por ello, los aceites naturales son una gran alternativa para la conservación de los alimentos y en la actualidad se proponen para reemplazar los antioxidantes sintéticos (Bouhdid *et al.*, 2008).

1.3 Composición química

Como ya hemos dicho los aceites esenciales son mezclas naturales de complejos, puede tener alrededor de 20 a 60 componentes a diferentes concentraciones. En general se caracterizan por tener dos o tres componentes principales a concentraciones relativamente altas (20-70%).

Los componentes se pueden caracterizar en dos grupos de diferente origen biosintético, (Pichersky *et al.*, 2006). El principal grupo se compone de terpenos y terpenoides y el otro de anillos aromáticos y constituyentes alifáticos, todos con un bajo peso molecular (Bakkali *et al.*, 2008).

1.4 Aceite esencial de *Oreganum compactum*

Es miembro de la familia *Lamiaceae*, el aceite proviene de una planta originaria del norte y centro de Marruecos donde crece de manera espontánea. En su país de orígenes es considerada beneficiosa contra enfermedades como la colitis, gastroenteritis, entre otras.

Se ha demostrado que tiene propiedades antimicrobianas, además de producir una acción tónica y estimulante debido principalmente por el contenido de fenoles, timol y carvacrol que contiene (Jeannot *et al.*, 2003).

Se utiliza popularmente como condimento culinario y para el tratamiento de dolencias digestivas o trastornos pulmonares. (Ennabili *et al.*, 2000). También se utiliza como conservante para la mantequilla.

Actualmente es conocido por poseer acción antimicrobiana, y por ello es objeto de nuestro estudio (Bouhdid *et al.*, 2008).

Estudios fitoquímicos mostraron el predominio en su composición de compuestos fenólicos como son el carvacrol y timol así como monoterpenos relacionados γ -terpineno y p-cimeno (Khadija Bakhy *et al.*, 2014).

1.5 El deterioro de los alimentos debido a los microorganismos.

Como ya sabemos los alimentos son una fuente de energía para los seres vivos, incluidos los microorganismos, los cuales crecen y dañan al alimento. Los microorganismos pueden presentarse en los alimentos de forma natural debido a que se encuentra en el animal de procedencia, o también puede deberse a causas extrínsecas como son la manipulación en el procesado del alimento.

Por ejemplo podemos encontrar en vacuno microorganismos responsables del deterioro en el almacenamiento refrigerado como son *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococos* y *Leuconostoc* algunos de ellos son objetivo de nuestro estudio.

Pero existen varios factores que afectan al crecimiento de los microorganismos como son la temperatura, el oxígeno, medio de cultivo, acidez y pH, el tiempo y la actividad de agua.

Nuestros microorganismos de estudio son aerobios y anaerobios facultativos y su temperatura de crecimiento óptima pertenece a la serie de los mesófilos aunque se encuentra en dos rangos: a 37 y 26°C. La temperatura óptima de crecimiento es aquella donde presenta mayor desarrollo, si la temperatura varía por encima o debajo la tasa de crecimiento decrece y puede llegar a detenerse. Por debajo de la temperatura óptima no se reproducen pero se inactivan quedando menos microorganismos viables.

En alimentos refrigerados cuya temperatura de conservación es de aproximadamente 5°C reduce o detiene el crecimiento de este tipo de microorganismo.

Uno de los factores que afecta al crecimiento y multiplicación de las bacterias es la composición del sustrato. En el presente trabajo se estudiarán como sustrato leches UHT de diferente contenido graso para evaluar el posible efecto de este componente en la capacidad antimicrobiana del aceite esencial estudiado.

1.6 Características de las bacterias estudiadas

La recuperación de los viales se realizó siguiendo las instrucciones de la Colección Española de Cultivos tipo para cada microorganismo (www.cect.org).

Las bacterias que habitualmente se encuentran en alimentos refrigerados crecen en un pH entre el 3,2 y 10,5 siendo su óptimo el 5,5-6,5, entre los utilizados la *Escherichia coli* es la más resistente a los cambios de pH (Bourgeois *et al.*, 1994)

1.6.1 *Serratia marcescens* (854)

Su taxonomía es la siguiente:

Dominio: Bacteria

- Clase: γ - *Proteobacterias*
- Orden: *enterobacterales*
- Familia: *Enterobacteriaceae*
- Género: *Serratia*
- Especie: *Serratia marcescens*

Como podemos observar está clasificada dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y como todos los miembros de la familia es anaerobio facultativo. Como todas las bacterias estudiadas no es patógena aunque está definida por muchos autores como oportunista ya que puede causar daños al ser humano causando un cuadro clínico de diferentes infecciones, meningitis, conjuntivitis, etc.

Los miembros de este género son gram negativos, móviles, anaerobiosis facultativos, oxidasa negativos y fermentan la glucosa y reducen el nitrato. Es capaz de crecer a una temperatura de 26°C, sus colonias son rosas y tienen un tiempo de incubación de 24 horas sobre medio de cultivo sólido.

La podemos encontrar en la tierra, agua e insectos además tiene una gran capacidad para sobrevivir bajo condiciones extremas. Además es muy característica entre las bacterias entéricas por su capacidad para segregar quitinasa extracelular (Hejazi *et al.*, 1997).

Se caracteriza por utilizarse como biomarcador biológico ya que produce un característico pigmento rojo denominado prodigiosina, el cual depende de las condiciones de crecimiento, estudios realizados afirman que el mayor incremento en biomasa y en pigmentación se encontró en cultivos con alto porcentaje de glicerol o en bajas concentraciones de NaCl por el contrario medios con glucosa no producen el pigmento.

El pigmento tiene papel en la respiración y tiene propiedades antibióticas, ya que se sabe que la biosíntesis de pigmento actúa como un mecanismo de protección frente a condiciones desfavorables y la velocidad de crecimiento no es la óptima.

Como todas las bacterias gram negativas se caracteriza por poseer en la estructura de la membrana exterior lipopolisacáridos (LPS), lo que le confiere a la bacteria una capa que le protege de los agentes tóxicos debido a la desaceleración en la penetración hacia el interior de esta.

LPS comprende tres regiones: el lípido A, el 0-antígeno y el núcleo. El antígeno se compone de una cadena de sacáridos repetidos, los cuales actúan como agente inmunogénico (Hejazi *et al.*, 1997).

1.6.2 *Pseudomonas fragi* (446T)

Presenta la siguiente taxonomía:

- Clase: Γ - proteobacterias
- Orden: *Pseudomonadales*
- Familia: *Pseudomonadaceae*
- Género: *Pseudomonas*
- Especie: *Pseudomonas fragi*

Nos encontramos frente a una bacteria psicrotrofa, gram negativa, con respiración aeróbica, no fermentadora de catalasa aunque oxidasa positiva. Capaz de crecer a temperaturas entre 2 y 35°C por ello, está implicada en el deterioro de alimentos en refrigeración sobretodo en productos cárnicos (Danilo Ercolini *et al.*, 2010).

Todo el género *Pseudomonas* es habitual en el deterioro de leche y sus productos, debido a la producción de enzimas extracelulares estables al calor llegando a sobrevivir a tratamiento térmicos como el UHT causando problemas de inestabilidad y deterioro precoz, es decir, disminuyendo la vida útil del producto. Como ocurre con la formación de lipasas las cuales son responsables de la hidrólisis de la grasa que conduce a la rancidez, o de las proteasas que tienen una actividad importante hacia a la fracción de caseína de la leche lo que provoca la gelificación de esta y la formación de sabores amargos (Danilo Ercolin *et al.*, 2010).

1.6.3 *Pseudomonas fluorescens* (378)

Como la anterior al igual que todos los microorganismos *Pseudomonadaceae* son gram negativa, con respiración aeróbica, no fermentadora de catalasa aunque oxidasa positiva.

Su clasificación en base a su taxonomía es la siguiente:

- Clase: Δ -*proteobacteria*
- Orden: *Pseudomonadales*
- Familia: *Pseudomonadaceae*
- Género: *Pseudomonas*
- Especie: *Pseudomonas fluorescens*

Son bacterias gram negativas, no esporulada, en forma de bastón, habitan en el suelo, plantas y superficies de agua, su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30°C aunque alcanza su crecimiento máximo a los 28°C. Son aerobios facultativo y oxidasa positivos. Su movilidad es posible gracias a flagelos polares múltiples.

También utiliza sideróforos para satisfacer la necesidad de hierro, produce pyoverdine sideróforo, responsable de su fluorescencia característica, es quelante de hierro sólo

cuando las concentraciones son bajas, por ello solo tiene fluorescencia cuando las concentraciones de hierro son bajas (Martínez-García, *et al.*, 2015)

1.6.4 *Shewanella putrefaciens* (5346T)

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Clase: *Δ-proteobacteria*
- Orden: *Alteromonadales*
- Familia: *Shewanellaceae*
- Género: *Shewanella*
- Especie: *Shewanella putrefaciens*

Esta entre las principales bacterias de descomposición a bajas temperaturas, sobretodo en el almacenamiento de mariscos gracias a su capacidad para reducir el óxido de trimetilamina (OTMA) a trimetilamina (TMA) que produce el olor característico de deterioro.

Se trata de un bacilo gram negativo, con respiración anaerobia utilizando varios aceptores de electrones, no formadores de esporas, móviles por flagelos polares. Capaces de fermentar la glucosa, es oxidasa y catalasa positivo. Además, degrada los aminoácidos que contienen azufre y es capaz de producir sulfuros volátiles incluyendo el sulfato de hidrógeno a partir de fuentes orgánicas e inorgánicas. Son heterógenos. Aunque son mesófilos sus condiciones óptimas de crecimiento es de 25°C y un pH 7,0 además son capaces de crecer a concentraciones altas de NaCl (Birte Fonnesbech Vogel *et al.*, 2005)

Es de gran interés en la actualidad ya que recientemente debido al calentamiento global se han detectado un crecimiento, además han aparecido cepas resistentes a los antibióticos (ABR) lo que plantea una gran preocupación en la salud pública y de los animales marinos (Lima-Bittercourt *et al.*, 2007)

Los miembros de este género están asociados al deterioro de las proteínas de los alimentos (Chang-Ho Kang *et al.*; 2013). Aunque no es patógeno es una bacteria oportunista que produce infecciones en pacientes inmunodeprimidos (Luis Muñoz *et al.*, 2014).

1.6.5 *Achromobacter denitrificans* (449)

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Clase: *β-proteobacteria*
- Orden: *Burkholderiales*
- Familia: *Alcaligenaceae*
- Género: *Achromobacter*
- Especie: *Achromobacter denitrificans*

Nos encontramos frente a una bacteria gram negativa, móvil, con respiración estrictamente aeróbica y que no fermenta la glucosa. Además es oxidasa y catalasa positiva (D.Lelli *et al.*, 2015)

1.6.6. *Listeria innocua* (910)

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Clase: *Bacilli*
- Orden: *Bacillales*
- Familia: *Listeriaceae*
- Género: *Listeria*
- Especie: *Listeria innocua*

La *Listeria innocua* es la especie más común de *Listeria* que se detecta en la industria alimentaria. Aunque no es una especie patógena es importante por ser un indicador de malas condiciones higiénicas que aumentan el riesgo de contaminación de los alimentos.

Es una bacteria gram positiva, cuya temperatura óptima es la característica de un mesófilo (30-37°C) pero pueden sobrevivir temperaturas extremas y pH extremos además de altas concentraciones de sal. Por ello, tiene gran relevancia en la industria de los alimentos ya que es capaz de crecer a temperatura de refrigeración, lo cual incrementa el riesgo de contaminación, aunque el riesgo disminuye con la aplicación de pasteurización de la leche.

Tiene movilidad mediante flagelos y es catalasa negativa. Es capaz de metabolizar el metano, azufre y nitrógeno, entre otros compuestos orgánicos e inorgánicos (Janneth Gallegos *et al.*, 2007)

Además, lleva a cabo numerosas rutas biosintéticas como la síntesis de peptidoglucano. Como otros miembros de su género son anaerobios facultativos, por lo tanto, son capaces de metabolizar la glucosa en condiciones aeróbicas produciendo ácido láctico y ácido acético y anaeróbicas produciendo solamente ácido láctico. (Buchrieser *et al.*, 2003).

1.6.7 *Leuconostoc carnosum* (4024T)

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Clase: *Bacilli*
- Orden: *Lactobacillales*
- Familia: *Leucooctocaceae*
- Género: *Leuconostoc*
- Especie: *Leuconostoc carnosum*

Está asociados a muchos hábitos diferentes y en alimentos de origen animal como son la leche y los productos lácteos, además de carne y pescado (Björkroth *et al.*, 2006).

Son arrancadores lácteos mesófilos responsables de la formación del aroma a mantequilla de determinados productos lácteos. En alimentos empaquetados producen un hinchazón debido a la formación de dióxido de carbono (Mayra-Mäkinen *et al.*, 2004).

Como todas las bacterias ácido lácticas poseen un gran número de propiedades metabólicas responsables de su potente éxito como cultivo iniciador en la fermentación de productos lácteos, carne, y bebidas de origen vegetal (Seong-Hyeuk Nam *et al.*, 2011).

Su forma es ovoide, son heterofermentativas capaces de producir dextrano a partir de sacarosa. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20 y 25°C. Son aerobios facultativos, requieren hidratos de carbono fermentable y un medio nutricional rico para crecer. Su fermentación produce lactato, etanol y gas. Son catalasa y citocromo negativos.

Forma colonias pequeñas, redondas y de un color grisáceo- blanco (Björkroth *et al.*, 2014).

Estas bacterias no son un riesgo para la salud de personas sanas, están considerados como organismos GRAS (Ogier *et al.*, 2008).

1.6.8 *Escherichia coli* (101)

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Clase: Γ - *Proteobacteria*
- Orden: *Enterobacteriales*
- Familia: *Enterobacteriaceae*
- Género: *Escherichia*
- Especie: *Escherichia coli*

Es un bacilo gram negativo, móvil por flagelos peritricos. Es anaerobio facultativo, fermentador ácido mixto ya que convierte el ácido fórmico en H₂ y CO₂ además también fermenta lactosa, no utiliza citrato. Es catalasa positiva y oxidasa negativa. Es un mesófilo con una temperatura óptima de 37°C e incapaz de crecer a temperaturas superiores a 44,5 °C. Lo podemos encontrar inicialmente en alimentos de origen animal como la leche sin pasteurizar.

Es un residente habitual del colon en seres humanos y algunos mamíferos de sangre caliente ya que su presencia es necesaria para producir vitamina B y K, pueden producir enfermedades como gastroenteritis o infecciones de las vías urinarias (Meng *et al.*, 2013).

1.6.9 *Alcaligenes faecalis* (145)

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Clase: *b-proteobacteria*
- Orden: *Burkholderiales*
- Familia: *Alcaligeaceae*
- Género: *Alcaligenes*
- Especie: *Alcaligenes faecalis*

Podemos encontrarlo comúnmente en plantas de suelo, y agua, son nitrificantes heterotróficas. Su crecimiento óptimo comprende el de un mesófilos.

Son bacterias gram negativa, aerobio estricto, con forma de bacilo y movilidad por flagelos. Son catalasa y oxidasa positiva (Zhao *et al.*, 2015).

1.6.10 *Enterococcus faecalis* (184)

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Clase: *Bacilli*
- Orden: *Lactobacillales*
- Familia: *Enterococcaceae*
- Género: *Enterococcus*
- Especie: *Enterococcus faecalis*

Se encuentran habitualmente en el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos, son causa de infecciones del tracto urinario, abdomen o pelvis.. Pueden actuar como agentes oportunistas, causando infecciones en los seres humanos, sin embargo su patogénesis es poco conocida (del Valle *et al.* , 2016).

Es una bacteria inmóvil, gram positiva, anaerobia facultativa, capaz de fermentar la glucosa sin producir gas, es capaz de crecer en cloruro de sodio 6,5%, así como en un rango extenso de pH y temperatura. Aunque su temperatura óptima pertenece a la serie de los mesófilos (Tanotkar *et al.*, 2014)

Debido a la capacidad antimicrobiana que presentan los aceites esenciales, especialmente aquellos que se han tenido un gran consumo a lo largo de su historia por aportar características organolépticas favorables al alimento, especialmente el aceite esencial de orégano utilizado por su suave aroma y sabor como es el caso del aceite esencial de orégano.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos principales

- El objetivo principal es evaluar el efecto del aceite esencial de orégano (*Oreganum compactum*) tanto por difusión en disco como en microdilución en diferentes sustratos (medio de cultivo, leche entera y leche desnatada) microorganismos habitualmente alterantes de alimentos refrigerados o indicadores de la presencia de patógenos: *Serratia marcescens* CECT 854, *Pseudomonas fragi* CECT 446T, *Pseudomonas fluorescens* CECT 378, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Alcaligenes faecalis* CECT 145, *Listeria innocua* CECT 910, *Escherichia coli* CECT 101, *Enterococcus faecalis* CECT 184 y *Achromobacter denitrificans* CECT 449, *Leuconostoc carnosum* 4024T.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto inhibitor del aceite esencial de orégano por ensayo de difusión en disco. Con ello pretendemos medir el efecto antimicrobiano in vitro por difusión.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de dicho aceite sobre las cepas mencionadas mediante el método de microdilución, con ello pretendemos medir el efecto antimicrobiano in vitro en condiciones de contacto directo del aceite con los microorganismos.
- Por último, evaluar mediante ensayo de microdilución el efecto del sustrato, específicamente del contenido graso al determinar la concentración mínima inhibitoria en leche desnatada con un 0,3% de materia grasa y leche entera con un 3.6% de materia grasa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos propuestos el plan de trabajo consistió en:

Seleccionar las 10 cepas de bacterias alterantes de alimentos o indicadores de la presencia de patógenos. Se adquirieron en la Colección Española de Cultivos tipo CECT de la Universidad de Valencia: *Serratia marcescens* CECT 854, *Pseudomonas fragi* CECT 446T, *Pseudomonas fluorescens* CECT 378, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Achromobacter denitrificans* CECT 449, *Alcaligenes faecalis* CECT 145, *Listeria innocua* CECT 910, *Leuconostoc carnosum* CECT 4024T, *Escherichia coli* CECT 101, *Enterococos faecales* CECT 854. Las cepas se adquirieron liofilizadas.

Evaluar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *O.compactum* frente a las cepas por difusión en disco en medio Mueller Hinton Agar.

Evaluar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *O.compactum* frente a las cepas por microdilución en medio Mueller Hinton, leche desnatada (0,3% grasa) y leche entera (3,6% grasa). En este caso se podía evaluar el efecto inhibitorio por contacto directo, también en un medio de cultivo y en dos alimentos de diferente contenido graso.

3.1 Aceite esencial

El aceite esencial de *O. compactum* fue suministrado por la empresa Herbes del Molí S.L. (Benimarfull, Alicante), el cual es un aceite procedente de agricultura ecológica.

3.1.1 Composición química del aceite esencial

La composición del aceite esencial de *Oreganum compactum* se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del aceite esencial de *Oreganum compactum*_determinado por cromatografía gaseosa. Fuente: Parra, 2014

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	% Área del perfil total
α -felandreno	9,091	0,51
Trans-beta-ocimeno	9,401	0,69
Canfeno	9,963	0,09
3-octanona	10,667	0,10

Mirceno	10,796	1,63
α -felandreno	11,629	0,23
Trans-beta-ocimeno	11,733	0,07
α -terpineno	11,986	2,10
Para-cimeno	12,287	9,69
Limoneno	12,444	0,33
Sabineno	12,579	0,20
1,8-cineol	12,665	0,08
trans-beta-cimeno	12,826	0,07
γ -terpineno	13,530	16,31
Terpinoleno	14,630	0,13
Para-cymenil	14,833	0,11
α -terpinoleno	15,018	1,34
3,5-heptadien-2-uno	15,884	0,05
Acetato de cis-carvyl	16,951	0,04
4-terpineol	18,944	0,39
thimyl metil éter	21,338	0,09
Timol	23,750	16,76
Carvacrol	24,330	46,78
Trans-cariofileno	30,259	1,93
α -humuleno	31,890	0,09
β -bisaboleno	33,852	0,05
δ -cadineno	34,461	0,06
Óxido de cariofileno	37,600	0,08

3.2 Medio de cultivo

Los medios de cultivos utilizados fueron Mueller-Hinton, leche entera con un 3,6% de grasa y leche desnatada con un 0,3% de grasa (UHT comercial, marca Consum). En la tabla 2 y 3 podemos observar la composición nutricional de la leche entera y desnatada respectivamente.

Tabla 2. Composición nutricional de la leche entera.

Información nutricional	Por 100 ml
Valor energético	62 Kcal
Grasa	3,6g
de las cuales saturadas	2,4g
Hidratos de carbono	4,5g
De los cuales azúcares	4,5 g
Proteínas	3g
Sal	0,1 g
Calcio	120 mg

Tabla 3. Composición nutricional de la leche desnatada.

Información nutricional	Por 100 ml
Valor energético	33 Kcal
Grasa	0,25 g
de las cuales saturadas	0,2g
Hidratos de carbono	4,7g
De los cuales azúcares	4,7 g
Proteínas	3,1 g
Sal	0,1 g
Calcio	120 mg

3.3 Cepas estudiadas

Las cepas de bacterias fueron seleccionadas por ser contaminantes comunes en productos lácteos y otros alimentos de origen animal refrigerados, nuestro estudio fue determinar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre ellas. Estas cepas fueron suministradas por la Universidad de Valencia y son las siguientes: *Serratia marcescens* CECT 854, *Pseudomonas fragi* CECT 446T, *Pseudomonas fluorescens* CECT 378, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Achromobacter denitrificans* CECT 449, *Alcaligenes faecalis* CECT 145, *Listeria innocua* CECT 910, *Leuconostoc carnosum* CECT 4024T, *Escherichia coli* CECT 101, *Enterococos faecales* CECT 184.

3.3.1 Recuperación de las cepas de estudio.

Las cepas se encontraban liofilizadas para su recuperación se siguió el siguiente protocolo: en primer lugar se realizó la preparación del medio de cultivo Müeller-Hinton estéril. El material lo podemos ver en la figura 1.

Una vez esterilizados los medios se procedieron a la recuperación de las bacterias liofilizadas, para ello, se introdujeron en un tubo 9 ml de caldo Mueller-Hinton y se realizó incubación de 24 o 48 horas a la temperatura óptima de cada cepa: los microorganismo de 26°C y 48 horas son *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens* y los de 37 °C 24 horas *Alcaligenes faecalis*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Enterococos faecales* y *Achromobacter denitrificans*. En la figura 2 podemos ver las cepas a 26°C mientras que en la figura 3 las cepas a 37°C.

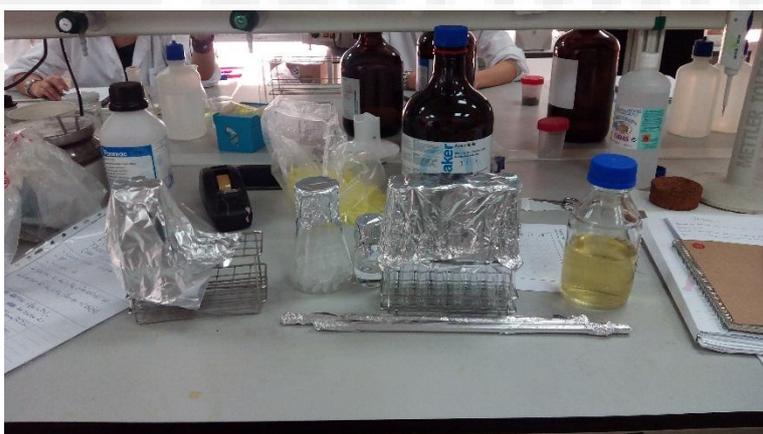


Figura 1. Medio de cultivo junto con los tubos y puntas de micropipeta.

Por recomendación para la obtención de una buena concentración de microorganismos viables, es decir, en estado exponencial, se realizaron 2 pases de siembra de las bacterias en tubos con 9 mL de medio de cultivo fresco, realizando siempre el mismo protocolo de incubación. En la figura 1 podemos ver el material necesario para el procedimiento.



Figura 2: Cepas en incubación a 26°C



Figura 3: Cepas en incubación a 37°C

3.4 Ensayos de actividad antimicrobiana mediante pruebas de difusión en disco.

Se realizó la prueba de actividad antimicrobiana por difusión en disco, para ello se emplearon discos de papel absorbentes esterilizados e impregnados con una concentración conocida del antimicrobiano. Cuando el disco se humedece crea un gradiente de concentración, siendo mayor cuando más cerca del disco está. El diámetro del anillo es proporcional a la sensibilidad o la resistencia del microorganismo, lo que determina el grado de resistencia de este aceite esencial (Evelyn Rodríguez *et al.*, 2006). El anillo del disco corresponde con la concentración mínima inhibitoria (MIC) para la combinación concreta de bacteria y aceite esencial.

En nuestro estudio preparamos el medio Mueller Hinton con agar-agar, en todas ellas se sembraron en superficie 0,1 mL del microorganismo, se situó el disco estéril en el centro de la placa y se adicionó diferentes cantidad de aceite en los discos estériles de 9 mm (0, 2, 5, 10,20 y 40µl) realizando 3 repeticiones en cada caso. A continuación se incubaron a su temperatura óptima durante 24 o 48 horas formándose así halos a causa de la inhibición del AE.

El objetivo de la concentración es determinar qué volumen de aceite esencial tiene un efecto inhibitor sobre las bacterias para ello puesto que los halos presentaron formas irregulares se tomaron varias medidas del diámetro y realizamos la prueba por triplicado.



Figura 4. Material del ensayo de difusión en disco.



Figura 5. Incubación en disco en estufa a 26°C.



Figura 6. Incubación en disco en estufa a 37°C.



Figura 7. Lectura del diámetro del halo de *Serratia marcescens*.

3.5 Determinación de la MIC

Se evaluó el efecto inhibitorio por contacto directo, en un medio de cultivo y en dos alimentos de diferente contenido graso.

Utilizamos este método por ser el “gold Standard” para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana ya que da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado. La placa de microdilución se compone de 96 pocillos (12mm x8 mm), donde se estudian 8 microorganismos con 11 diluciones de cada uno, la última columna se puede utilizar como control de crecimiento (blanco). A continuación de la siembra las placas deben sellarse con adhesivo para evitar la evaporación durante la incubación que debe hacerse a la temperatura ideal de cada microorganismo. Tras la incubación se pueden observar turbidez pero para unos resultados más precisos se procede a la adición de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5 difeniltetazolium (MTT). (Gil *et al.*, 1999).

El MTT tiene una coloración amarilla y se utiliza para estudios de proliferación celular ya que cuantifica la actividad de la deshidrogenasa presente en las células vivas, cuando esta enzima reduce el MTT a formazán cambia la coloración a púrpura ya que este último es un compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violetas. Lo que permite correlacionar el color púrpura con la viabilidad del microorganismo. (Martínez *et al.*, 2013).

En nuestro estudio se realizó un ensayo de microdilución en caldo donde se evaluaron los medios Mueller-Hinton, leche desnatada (0,3% de grasa) y leche entera (3,6% de grasa) en microplacas individuales con dos repeticiones de cada microorganismos dejando un blanco en cada extremo de la placa y dividiéndolos según la temperatura de incubación de cada uno de ellos, teniendo un total de 6 placas. Donde el procedimiento que se siguió fue que en la primera columna de las 8 se adicionó 200 μ l de AE disuelto en (agua, leche desnatada o Leche entera con 0.1% de tween 80 como emulsionante y concentración de aceite de 40 μ l/mL y se realizó a continuación un banco de diluciones de modo que los pocillos contenían concentraciones decrecientes. Seguidamente se adiciono 95 μ l de medio Mueller-Hinton en cada pocillo, obteniendo en cada uno de ellos un total de 195 μ l. Por último a cada pocillo se le adiciono 0,5 μ l del inóculo completando el volumen de 200 μ l, obteniendo un volumen por pocillo de:

- Pocillo 1: 20 μ l/mL
- Pocillo 2: 10 μ l/mL
- Pocillo 3: 5 μ l/mL
- Pocillo 4: 2,5 μ l/mL
- Pocillo 5: 1,25 μ l/mL
- Pocillo 6: 0,625 μ l/mL
- Pocillo 7: 0,3125 μ l/mL
- Pocillo 8: 0,156 μ l/mL

Por último se llevaron las microplacas a un agitador a 150 rpm durante 2 minutos y se llevaron a incubación a 26°C durante 24 horas.

Se realizó el mismo proceso para las microplacas de leche entera y desnatada.

Después de la incubación se procedió al tratamiento con el colorante de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), para ello se añadió a cada pocillo 25µl de MTT dimetil sulfóxido (0,8 mg /mL) y se incubó durante 1 hora con el fin de permitir que los microorganismos viables metabolizaran el colorante MTT de color amarillo a formazán, el cual como se ha explicado anteriormente es de color violeta y de esta forma poder determinar el MIC. El MIC es la primera columna la cual no presenta cambio de color (Ruiz *et al.* 2012). Con el fin de comprobar algunos resultados obtenidos se extrajeron 10 µl de los pocillos y se sembraron en placas petri.

Todo el material utilizado lo podemos ver en la figura 8.



Figura 8. Preparación del material para la prueba MIC.

Este ensayo se realizó por duplicado para todos los microorganismos en los medios Mueller-Hinton, leche desnatada y leche entera.

3.6 Tercer ensayo: Comprobación de los resultados MIC mediante siembra por estría.

Para verificar los resultados obtenidos por el cambio en la coloración se procedió a sembrar en estría 10 µl de cada pocillo en agar MH. Esta técnica es utilizada para aislar cepas pura en una placa petri, en nuestro estudio dividimos la placa petri en 8 porciones cada una de ellas corresponde a un pocillo de MIC con una concentración determinada de AE, siendo el 1 el menos diluido y la porción 8 la mas diluida.

A continuación se incubaron a la temperatura y tiempo óptimo de cada bacteria, por último obtuvimos una lectura de los resultados precisos.

3.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico IBM SPSS versión 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) con el cual se realizaron los test convencionales para determinar las medias y las desviaciones estándar; y para determinar las diferencias entre muestras se realizó el test de Tukey, utilizando un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Así mismo, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) univariante para cada una de las levaduras.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Actividad antimicrobiana determinada por prueba de difusión en disco.

En las siguientes tablas podemos observar los datos de la media de los diámetros de los halos de inhibición para las 10 bacterias de estudio frente a diferentes cantidades de aceite esencial.

Se realizaron 3 medidas de las 3 placas realizadas para cada concentración del aceite esencial, a continuación se realizó una media los diámetros de los halos.

Cabe destacar que la zona bactericida del aceite esencial es donde se han destruido todos los microorganismos, mientras que la zona bacteriostática, es aquella donde el crecimiento del microorganismo se ve reducido (zona de crecimiento débil) gracias a la acción del aceite esencial.

Tabla 4. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Serratia marcescens* CECT 854. (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (µl)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	Todo el disco rojo	
2,5	1,98	sin actividad del AE
5	2,03	5,60
10	3,38	4,32
20	2,52	4,00
40	2,87	4,23

En la tabla anterior podemos observar como la medida de los halos aumenta conforme aumenta la concentración del aceite esencial. El efecto empieza a notarse en la concentración de 2,5 µl aunque sólo exista zona una pequeña zona bacteriostática. La acción máxima se observa en la concentración 40 µl donde se puede observar claramente ambas zonas (figura 9).

Como el aceite esencial *Oreganum compactum* es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos en cantidades mayores de 5 µl, podemos afirmar que nuestro aceite es bacteriostático en dichas cantidades, mientras que como es capaz de destruir la bacteria

en todas las cantidades ensayadas, podemos decir que es bacteriocida para *Serratia marcescens*.

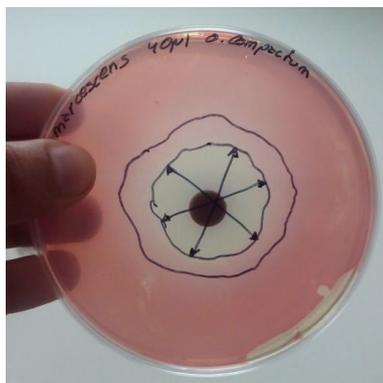


Figura 9. *Serratia marcescens* con una cantidad de 40 µl de AE

Tabla 5. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Pseudomonas fragi* CECT 446T (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (µl)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	Todo el disco amarillo	
2,5	1,38	2,03
5	1,09	1,71
10	1,44	2,63
20	1,30	1,93
40	2,50	3,82

En la tabla anterior podemos observar las medias de los diámetros de los halos obtenidos para cada concentración del aceite esencial.

Aunque en este caso los datos son un poco heterogéneos podemos ver como igual que en el caso anterior la inhibición máxima se sitúa en la concentración de 40 µl, pero se puede apreciar fácilmente la bacteriocida y la zona bacteriostática ya en la concentración de 2,5 µl, como podemos observar en la figura 10, también podemos comprobar en las siguientes fotografías como medida que aumentan las concentraciones aumentan ambas zonas (figura 11 cantidad de 10 µl y figura 12 cantidad de 20 µl).

Como el aceite esencial *Oreganum compactum* es capaz de inhibir el crecimiento y de destruir los microorganismos en todas las concentraciones, podemos afirmar que

nuestro aceite es bacteriostático y bacteriocida en todas las cantidades ensayadas para *Pseudomonas fragi*.

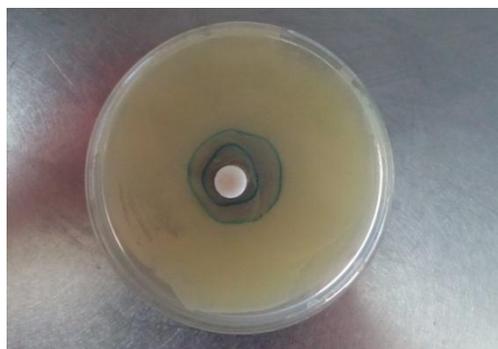


Figura 10. *Pseudomonas fragi* con una cantidad de 2,5 µl del AE.

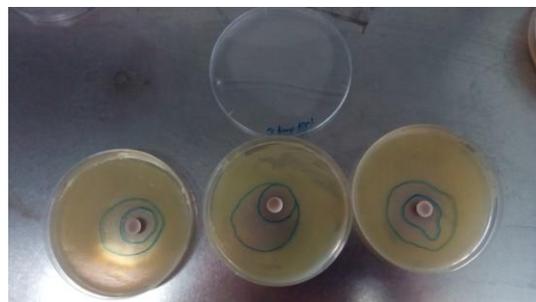


Figura 11. *Pseudomonas fragi* con una cantidad de 10 µl del AE.

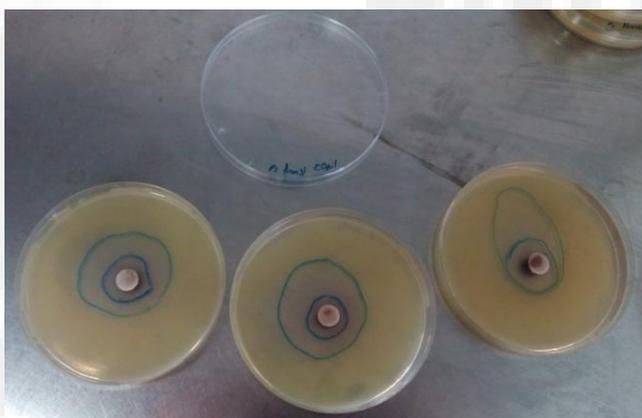


Figura 12. *Pseudomonas fragi* con una cantidad de 20 µl del AE.

Tabla 6. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Pseudomonas fluorescens* CECT 378 (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (μl)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	Todo el disco amarillo	
2,5	1,38	Sin actividad del AE
5	1,29	2,24
10	1,33	2,10
20	1,19	1,98
40	1,88	3,43

Como en los casos anteriores conforme aumenta la cantidad de aceite esencial aumenta el diámetro del halo, tanto en la zona bacteriocida como en la bacteriostática. Con la excepción de 2,5 μl, donde el crecimiento de todos los microorganismos fue inhibido.

Como anteriormente la acción máxima la obtenemos a 40 μl (figura 13), pero también podemos observar dos zonas a cantidad de 20,10 y 5 μl. (figuras 14,15 y 16 respectivamente).

Por lo que observamos que el aceite esencial *Oreganum compactum* es capaz de inhibir el crecimiento y de destruir los microorganismos por lo tanto, podemos afirmar nuestro aceite es bacteriostático y bacteriocida para *Pseudomonas fluorescens*.



Figura 13. *Pseudomonas fluorescens* con una cantidad de 40 μl del AE

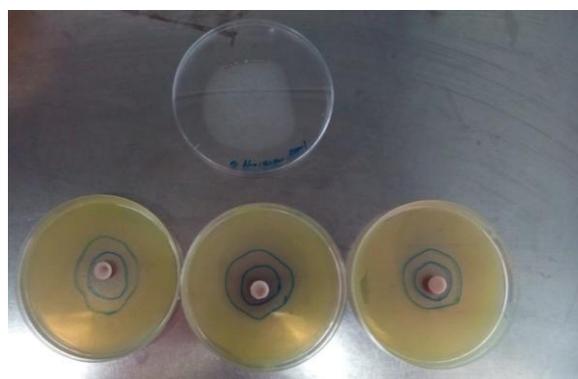


Figura 14. *Pseudomonas fluorescens* con una cantidad de 20 μl del AE.

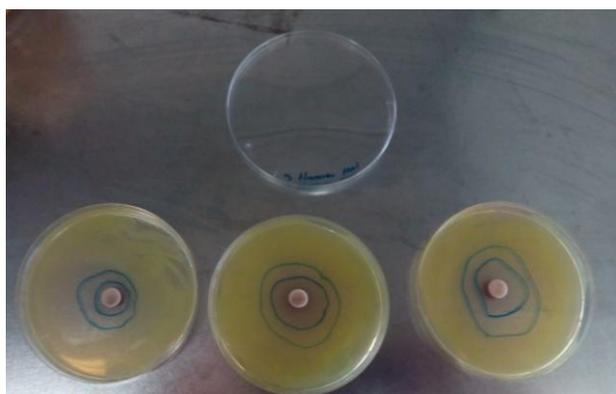


Figura 15. *Pseudomonas fluorescens* con una cantidad de 10 µl del AE

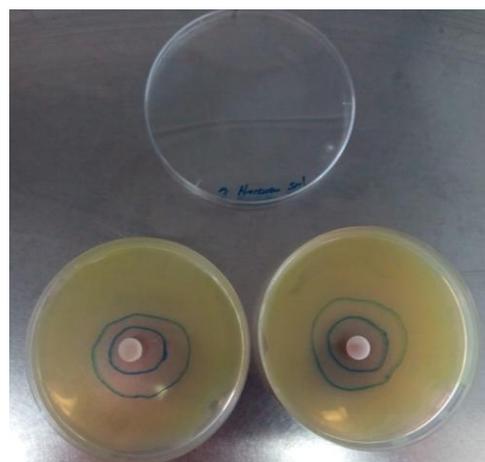


Figura 16 *Pseudomonas fluorescens* con una cantidad de 5 µl del AE

Tabla 7. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (µl)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	Todo sin actividad del AE	sin actividad del AE
2,5	1,55	sin actividad del AE
5	3,23	4,63
10	2,35	4,25
20	2,16	5,20
40	2,56	4,41

En este caso la acción máxima la obtenemos con 5 μ l, pero podemos observar una actividad del aceite esencial en todas las concentraciones ensayadas, por lo que podemos decir que el aceite esencial *Oreganum compactum* es bacteriocida para todas las concentraciones ensayadas, mientras que es bacteriostático en cantidades superiores a 5 μ l para *Shewanella putrefaciens*

En las siguientes figuras podemos observar los halos de 40 μ l (figura 17).

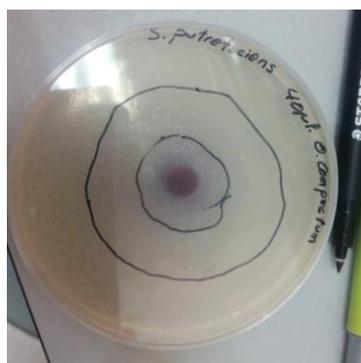


Figura 17. *Shewanella putrefaciens* con una cantidad de 40 μ l de AE

Tabla 8. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Alcaligenes faecalis* CECT 145 (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (μ l)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	Todo el disco marrón	
2,5	sin actividad del AE	sin actividad del AE
5	1,53	3,87
10	2,35	4,08
20	1,61	3,16
40	2,56	4,41

Observando la tabla anterior podemos decir que a cantidad de 2,5 μ l el aceite esencial *Oreganum compactum* no tiene acción bacteriostático ni bacteriocida sobre *Alcaligenes faecalis*.

Pero a partir de dicha cantidad si encontramos una inhibición de crecimiento y una destrucción de los microorganismos, siendo su acción máxima a 40 μ l (figura 18).

Por lo que podemos decir que la bacteria *Alcaligenes faecalis* fue inhibida por concentraciones mayores de 2,5 μ l del aceite esencial *Oreganum*, por lo tanto, tiene acción bacteriostático y bacteriocida para *Alcaligenes faecalis*.



Figura 18. *Alcaligenes faecalis* con una cantidad de 40 μ l del AE.

Tabla 9. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Listeria innocua* CECT 910. (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (μ l)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	todo puntos	
2,5	sin actividad del AE	
5	sin actividad del AE	sin actividad del AE
10	1,92	4,53
20	2,20	4,63
40	2,56	4,41

En este caso no se ha observado ninguna actividad del aceite esencial hasta la cantidad de 10 μ l, a partir de donde se fue aumentando el halo hasta los 40 μ l.

Por ello podemos afirmar que la bacteria *Listeria innocua* no fue inhibida a concentraciones menores de de 10 μ l, lo que significa que el aceite esencial *Oreganum compactum* no es capaz de inhibir el crecimiento ni de destruir los microorganismos a dichas cantidades, sin embargo si presenta actividades bacteriostático y bacteriocida a cantidades de 10,20 y 40 μ l (figura 19).



Figura 19. *Listeria innocua* con una cantidad de 40 μ l del AE

Tabla 10. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Escherichia coli* (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (μl)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	todo	
2,5	2,37	sin actividad del AE
5	1,64	2,95
10	2,18	3,78
20	2,28	4,43
40	2,15	3,19

Como podemos ver en la tabla anterior la bacteria *Escherichia coli* tiene actividad en todas las concentraciones ensayadas menos en 2,5 μl donde sólo tiene actividad bacteriocida (figura 20) por lo tanto, podemos afirmar que el aceite esencial *Oreganum compactum* es capaz de inhibir el crecimiento en todas las concentraciones y de destruir los microorganismos a partir de 5 μl por lo tanto, podemos afirmar que nuestro aceite es bacteriostático en cantidades mayor a 2,5 μl y bacteriocida en cantidades mayor a 5 μl para *Escherichia coli*.

A continuación en la figura 21 también podemos observar para 40 μl y en la figura 22 a 10 μl .



Figura 20. *Escherichia coli* con una cantidad de 2,5 μl del AE



Figura 21. *Escherichia coli* con una cantidad de 40 µl del AE.



Figura 22. *Escherichia coli* con una cantidad de 10 µl del AE.

Tabla 11. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Achromobacter denitrificans* CECT 449 (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (µl)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	todo	
2,5	2,14	sin actividad del AE
5	1,48	3,06
10	1,68	3,07
20	1,56	3,05
40	1,38	2,57

Como podemos ver en la tabla anterior la bacteria *Achromobacter denitrificans* tiene actividad en todas las concentraciones ensayadas menos en 2,5 μl donde sólo tiene actividad bacteriocida, por lo tanto, podemos afirmar que el aceite esencial *Oreganum compactum* es capaz de inhibir el crecimiento en todas las concentraciones y de destruir los microorganismos a partir de 5 μl por lo tanto, podemos afirmar que nuestro aceite es bacteriostático en cantidades mayor a 2,5 μl y bacteriocida en cantidades mayor a 5 μl (figura 23) para *Achromobacter denitrificans*.

Podemos observar los halos en concentraciones de 10 μl (figura 24) y 20 μl (figura 25).

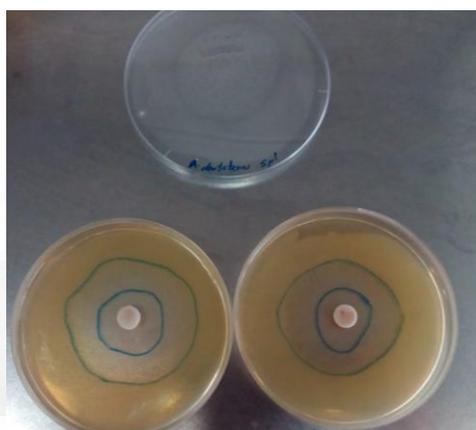


Figura 23. *Achromobacter denitrificans* con una cantidad de 5 μl del AE.

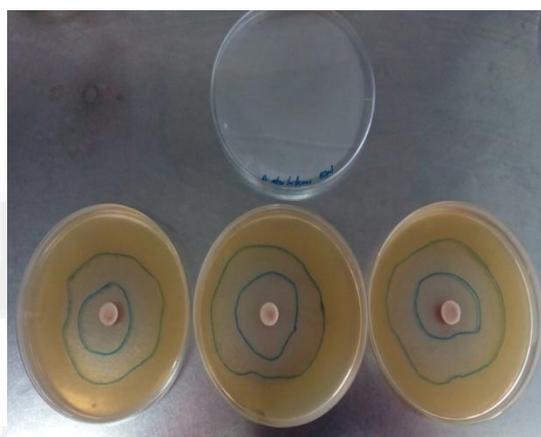


Figura 24. *Achromobacter denitrificans* con una cantidad de 10 μl del AE.

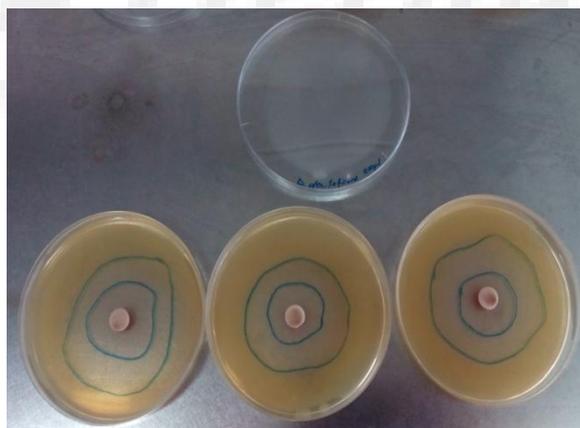


Figura 25. *Achromobacter denitrificans* con una cantidad de 20 μl del AE

Tabla 12. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Leuconostoc carnosum* 4024T (n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (μl)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	todo puntos	
2,5	0,92	sin actividad del AE
5	0,94	sin actividad del AE
10	0,79	sin actividad del AE
20	3,94	1,76
40	2,55	4,41

Podemos observar que la bacteria *Leuconostoc carnosum* mantuvo el crecimiento hasta concentraciones de 20 μl, por lo tanto, podemos decir que el aceite esencial no tiene efecto bacteriostático hasta dicha cantidad, Comparado con las anteriores cepas es menos efectivo para *Leuconostoc carnosum*.

El aceite esencial si tiene actividad bacteriocida y bacteriostática en todas las concentraciones ensayadas. En la figura 26 podemos observar ambas zonas.



Figura 26. *Leuconostoc carnosum* con una cantidad de 40μl del AE.

Tabla 13. Datos de la media de los diámetros (en cm, incluyendo el diámetro del disco 0,9 cm) de los halos de inhibición del aceite esencial *Oreganum compactum* sobre *Enterococcus faecalis* CECT 145(n= 9, correspondiente a 3 mediciones en 3 repeticiones independientes).

Cantidad de AE (µl)	Diámetro halo	
	Zona bacteriocida (cm)	Zona bacteriostática (cm)
0	sin actividad del AE	
2,5	1,66	sin actividad del AE
5	1,87	1,61
10	1,85	2,17
20	1,84	2,32
40	2,55	4,41

En este caso la bacteria no muestra inhibición hasta cantidad de 5 µl, por lo tanto, podemos decir que es bacteriostática para cantidades mayores a la citada. Pero si podemos observar una actividad bacteriocida del aceite esencial en todas las cantidades ensayadas, por lo tanto, el aceite esencial *Oreganum compactum* es bacteriocida frente a *Enterococcus faecalis* en las cantidades de ensayo.

En cuanto a los resultados en el diámetro de inhibición vemos que los datos obtenidos son similares al estudio hecho por S .Bouhdidm *et al.* (2008) quienes también evaluaron la actividad antibacteriana del aceites esencial *Oreganum compactum* con una concentración de 50 µl frente a diferentes bacterias sus resultados fueron: *Escherichia coli* 20 mm, *Listeria innocua* obtuvo 32 mm de diámetro de inhibición y *Pseudomonas fluorescens* tan sólo 5 mm.

Los resultados obtenidos en el estudio actual con concentraciones de 40 µl fueron muy similares (*Escherichia coli* 21,5 mm, *Listeria innocua* obtuvo 25,6 mm de diámetro de inhibición y *Pseudomonas 18,8 fluorescens*).

El mismo autor también realizó ensayos para *Staphylococcus aureus* CECT 976 y obtuvo como resultado 12 mm, para *Staphylococcus aureus* CECT 794 obtuvo un halo de 10 mm, *Enterococcus faecium* CECT 410 obtuvo 22 mm, *Listeria monocytogenes* CECT 4032 obtuvo 15,5 mm y por último *Pseudomonas aeruginosa* CECT 1107 y CECT 118 obtuvieron un diámetro casi nulo (2 y 1 mm respectivamente). Resultados muy similares a los realizados en el estudio actual donde podemos comprobar la poca actividad que tiene el aceite esencial *Oreganum compactum* frente a la especie

Pseudomonas, debido posiblemente a que son gram negativa y muestran una mayor protección.

4.2 Actividad antimicrobiana en medio liquido

Como ya hemos dicho realizamos en microplacas ensayos para ambas temperatura en los tres medios Mueller-Hinton (figura 27 y 28, leche desnatada (figura 29 y 30) y leche entera (figura 31 y 32).

Los resultados se pueden apreciar en la figura 27 y tabla 12:

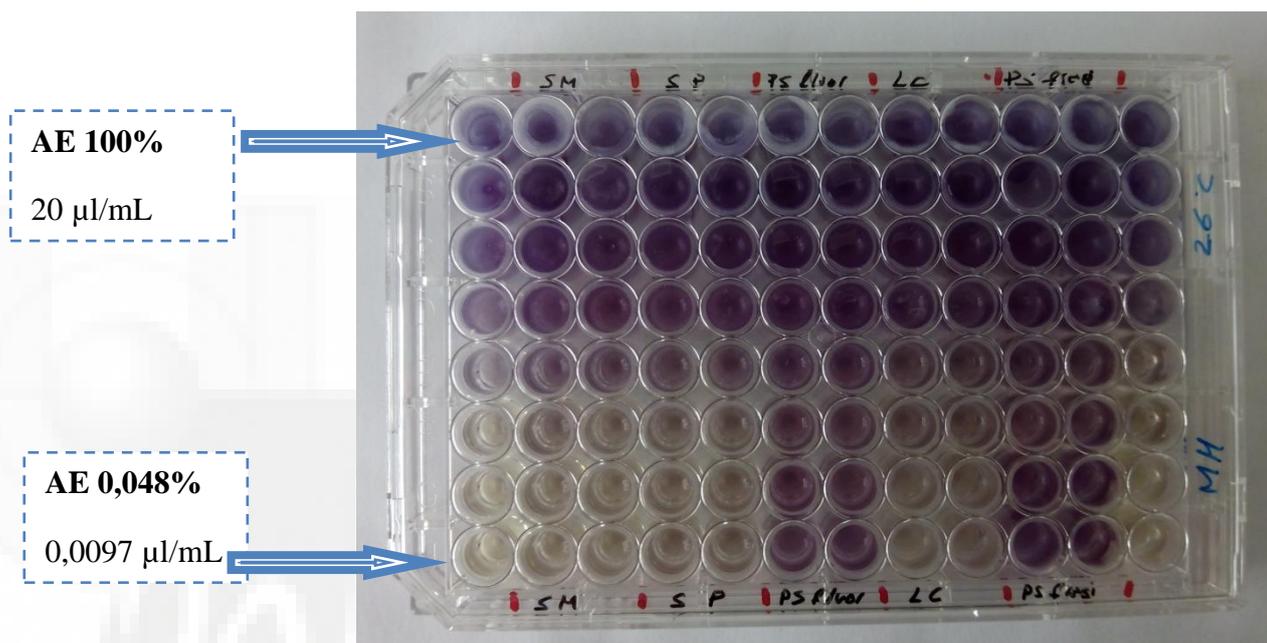


Figura 27. MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Serratia marcescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc carnosum*, en medio Mueller-Hinton a con el colorante a 37°C durante 48 horas.

Tabla 14. Resumen MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Serratia marcescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc carnosum*, en medio Mueller-Hinton a con el colorante a 37°C durante 48

Mueller-Hinton 26°C

Contenido	Concentración AE (µl/mL) Pocillo 1	Concentración AE (µl/mL) Pocillo 2
<i>Pseudomonas fragi</i>	2,50	2,50
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,50	2,50
<i>Leuconostoc carnosum</i>	2,50	2,50
<i>Shewanella putrefaciens</i>	2,50	2,50
<i>Serratia marcescens</i>	2,50	2,50

En la figura anterior se puede observar la reacción del colorante, los pocillos teñidos de violeta indican inhibición mientras que los amarillos indican crecimiento. Las concentraciones de aceite esencial para cada pocillo son de:

1. Pocillo 1: 20 µl/mL
2. Pocillo 2: 10 µl/mL
3. Pocillo 3: 5 µl/mL
4. Pocillo 4: 2,5 µl/mL
5. Pocillo 5: 1,25 µl/mL
6. Pocillo 6: 0,625 µl/mL
7. Pocillo 7: 0,3125 µl/mL
8. Pocillo 8: 0,156 µl/mL

Como podemos observar conforme bajamos de pocillo disminuimos a la mitad la concentración del aceite esencial.

Observando los resultados podemos decir que *Serratia marcescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens* y *Leuconostoc carnosum* en medio Mueller-Hinton tienen un MIC de 2,5 µl/mL.

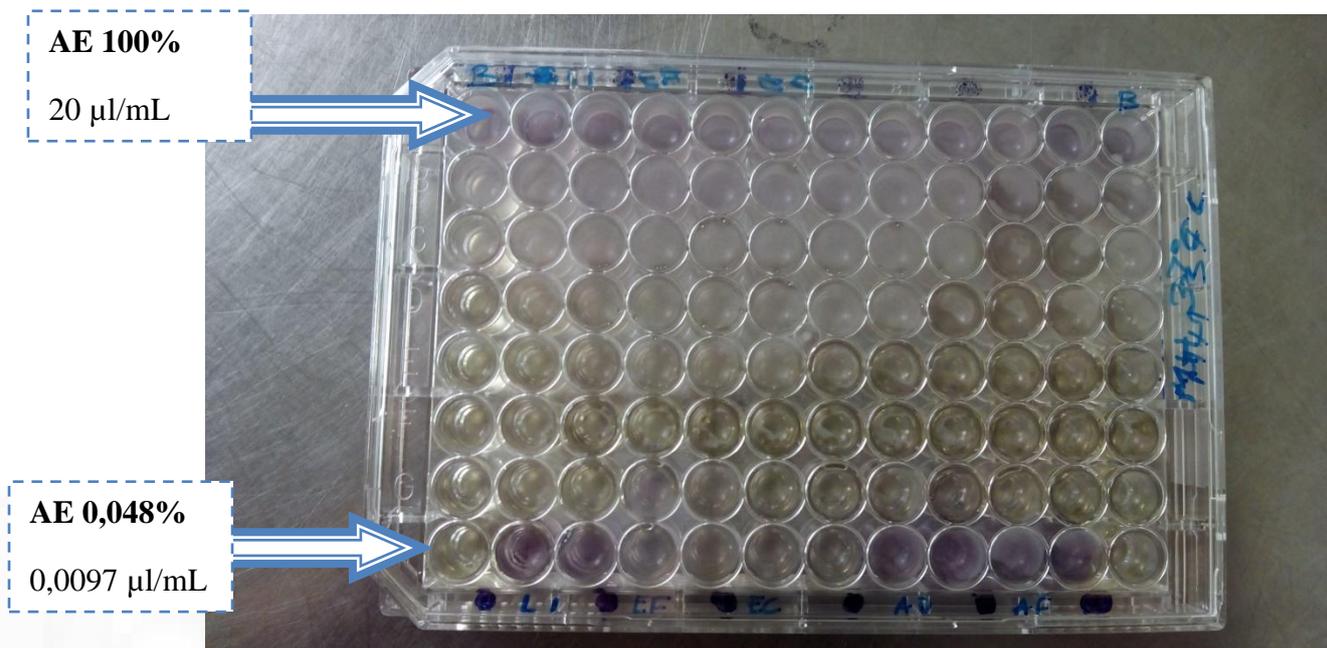


Figura 28. MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Achromobacter denitrificans*, *Alcaligenes faecalis* en medio Mueller-Hinton a con el colorante a 37°C durante 48 horas.

En la figura anterior se puede observar la reacción del colorante, los pocillos teñidos de violeta indican inhibición mientras que los amarillos indican crecimiento. Las concentraciones de aceite esencial para cada pocillo son de:

1. Pocillo 1: 20 µl/mL
2. Pocillo 2: 10 µl/mL
3. Pocillo 3: 5 µl/mL
4. Pocillo 4: 2,5 µl/mL
5. Pocillo 5: 1,25 µl/mL
6. Pocillo 6: 0,625 µl/mL
7. Pocillo 7: 0,3125 µl/mL
8. Pocillo 8: 0,156 µl/mL

Tabla 15. Resumen MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Achromobacter denitrificans*,

Mueller-Hinton

Contenido	Concentración AE (µl/mL) Pocillo 1	Concentración AE (µl/mL) Pocillo 2
<i>Listeria innocua</i>	0,3125	0,3125
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,625	0,625
<i>Escherichia coli</i>	0,3125	0,3125
<i>Achromobacter denitrificans</i>	0,3125	0,625
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,3125	0,3125

Observando los resultados anteriores podemos decir que *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Achromobacter denitrificans* y *Alcaligenes faecalis* tienen un MIC de 0,3125 µl/ml, mientras que *Enterococcus faecalis* tiene un MIC de 0,625 µl/mL.

Los resultados para leche desnatada se pueden observar en las figuras 29 y 30.

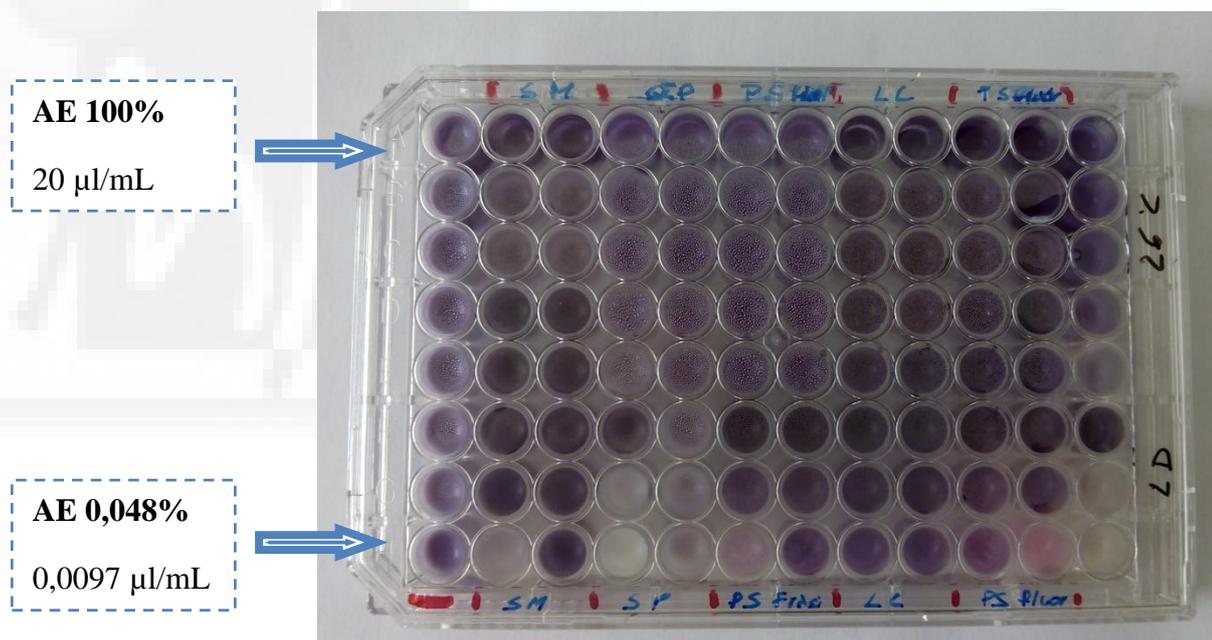


Figura 29. MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Serratia marcescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc carnosum*, en medio leche desnatada con el colorante a 37°C durante 48 horas.

Los resultados se pueden apreciar mejor en la tabla 13, mostrada a continuación.

Tabla 16. Resumen MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Serratia marcenscens*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc carnosum*, en medio leche desnatada.

Leche desnatada a 26°C

Contenido	Concentración AE (µl/mL) Pocillo1	Concentración AE (µl/mL) Pocillo 2
<i>Pseudomonas fragi</i>	1,25	2,50
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,50	1,25
<i>Leuconostoc carnosum</i>	2,50	1,25
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1,25	2,50
<i>Serratia marcenscens</i>	5,00	5,00

Como podemos observar los resultados de *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens* y *Leuconostoc carnosum* fueron muy similares, tuvieron un MIC de 2,5 µl/mL.

Sin embargo *Shewanella putrefaciens* tuvo una actividad mayor, su MIC es de 1,25 µl/mL del aceite esencial.

Por último la actividad de *Serratia marcenscens* fue mucho mayor que las anteriores, ya que su MIC es de 5 µl/mL del aceite esencial.

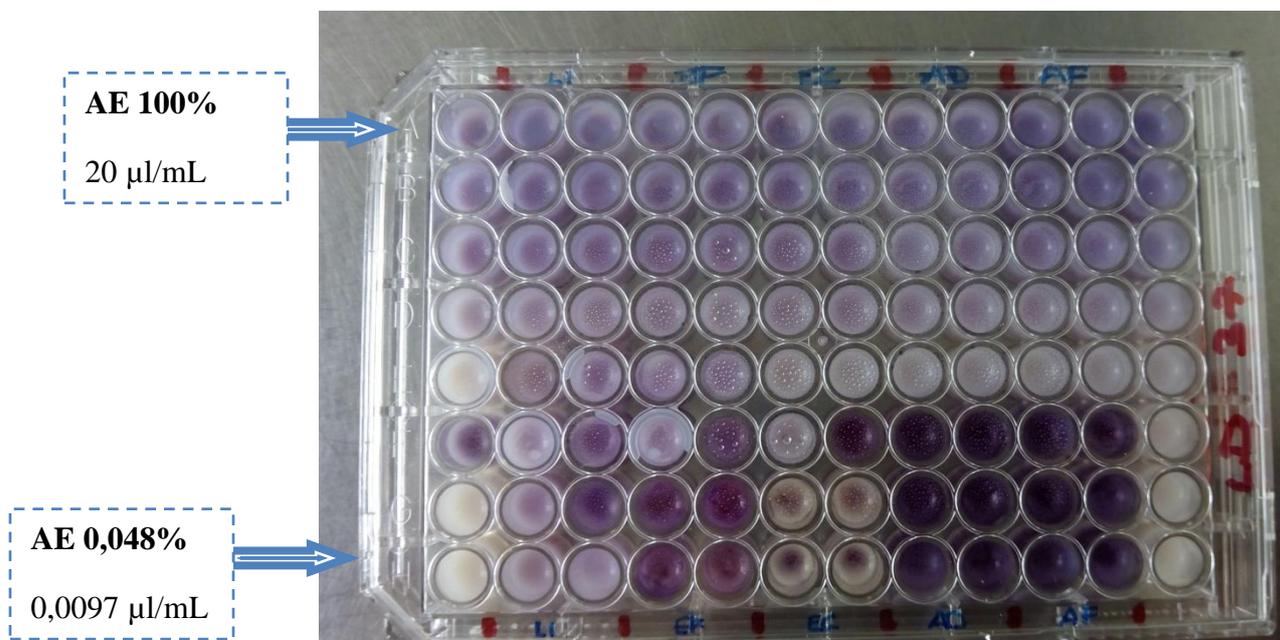


Figura 30. MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Achromobacter denitrificans*, *Alcaligenes faecalis* en leche desnatada con el colorante a 37°C durante 48 horas.

Los resultados se pueden apreciar mejor en la tabla 14, mostrada a continuación.

Tabla 17. Resumen MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Achromobacter denitrificans*, *Alcaligenes faecalis* en leche desnatada.

Leche desnatada a 37°C

Contenido	Concentración AE (µl/mL) Pocillo1	Concentración AE (µl/mL) Pocillo 2
<i>Listeria innocua</i>	2,50	2,50
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,25	0,63
<i>Escherichia coli</i>	1,25	1,25
<i>Achromobacter denitrificans</i>	1,25	1,25
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1,25	1,25

Como podemos observar los resultados de todas las bacterias presentan actividad muy parecida, observando la tabla podemos afirmar que, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Achromobacter denitrificans* y *Alcaligenes faecalis* un MIC de 1,25 $\mu\text{l/mL}$.

Sin embargo *Listeria innocua* presenta una actividad mayor, su MIC es de 2,5 $\mu\text{l/mL}$.

Los resultados para leche entera se pueden observar en las figuras 31 y 32.

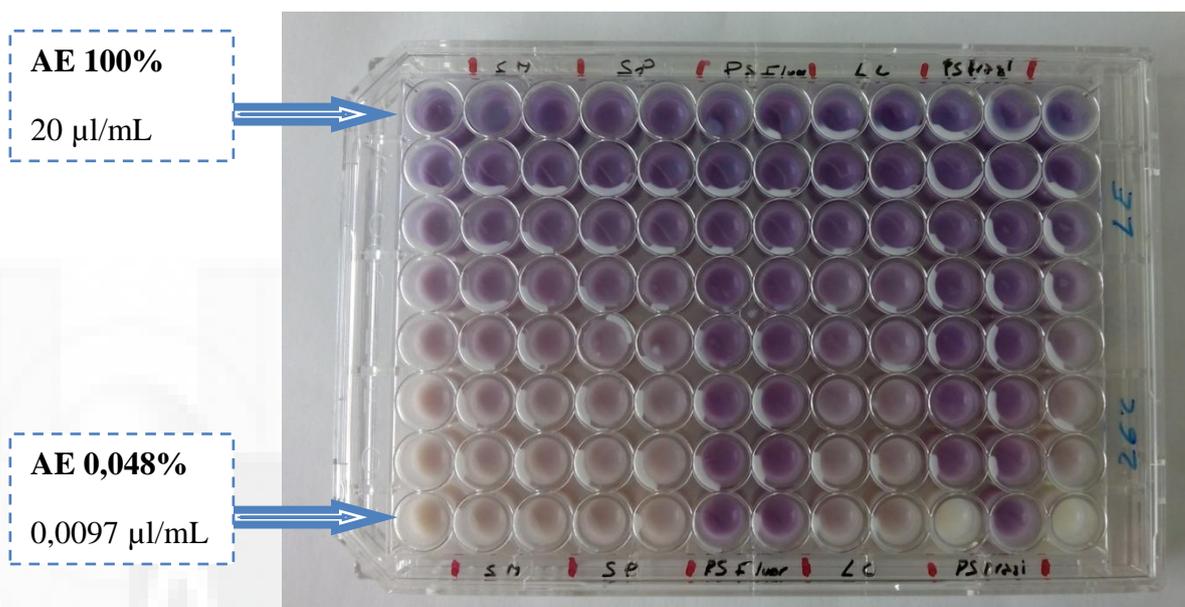


Figura 31. MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Serratia marcescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc carnosum*, en medio leche entera con colorante a 37°C durante 48horas.

Los resultados se pueden apreciar mejor en la tabla 15, mostrada a continuación.

Tabla 17. Resumen MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Serratia marcenscens*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc carnosum*, en medio leche entera.

Leche entera a 26°C

Contenido	Concentración AE (µl/mL) Pocillo1	Concentración AE (µl/mL) Pocillo 2
<i>Pseudomonas fragi</i>	20,00	20,00
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20,00	20,00
<i>Leuconostoc carnosum</i>	20,00	20,00
<i>Shewanella putrefaciens</i>	20,00	20,00
<i>Serratia marcenscens</i>	10,00	10,00

Se aprecia claramente que con presencia de grasa la bacteria no tienen actividad en las concentraciones ensayadas menos en *Serratia marcenscens* donde podemos observar una actividad en el primer pocillo, es decir, su MIC es de 10 µl/mL.

Esto posiblemente se deba a la presencia de la grasa en el medio, ya que es la única diferencia frente a la leche desnatada.

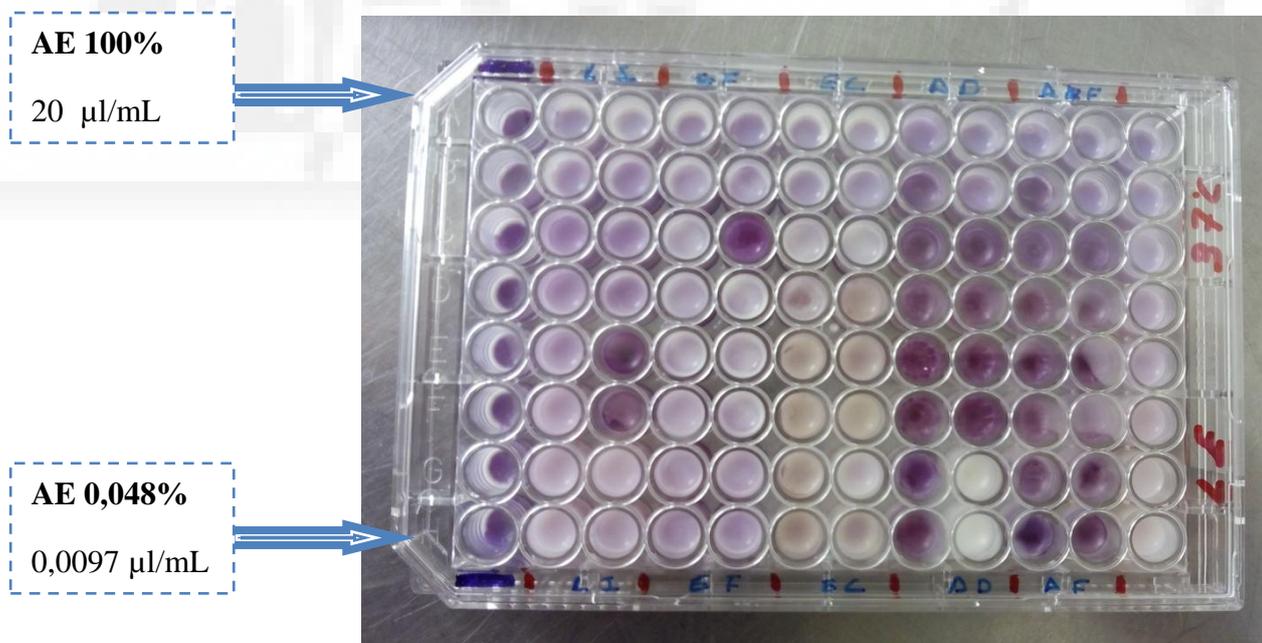


Figura 32. MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Achromobacter denitrificans*, *Alcaligenes faecalis* en leche entera con el colorante a 37°C durante 48 horas.

Los resultados se pueden apreciar mejor en la tabla 16, mostrada a continuación.

Tabla 19. Resumen MIC del AE *Oreganum compactum* observado para *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Achromobacter denitrificans*, *Alcaligenes faecalis* en leche entera.

Leche entera a 37°C

Contenido	Concentración AE (µl/mL) Pocillo1	Concentración AE (µl/mL) Pocillo 2
<i>Listeria innocua</i>	2,50	2,50
<i>Enterococcus faecalis</i>	10,00	5,00
<i>Escherichia coli</i>	5,00	5,00
<i>Achromobacter denitrificans</i>	20,00	10,00
<i>Alcaligenes faecalis</i>	20,00	10,00

Podemos observar una actividad menor que en el caso de le leche desnatada.

En este caso *Listeria innocua* es la bacteria con una actividad más duradera con un MIC de 12,5 µl/mL. *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* muestran una actividad menor con un MIC de 2,5 µl/mL.

Por último *Alcaligenes faecalis* tiene una actividad aún menor su MIC es de 20-10 µl/mL del aceite esencial.

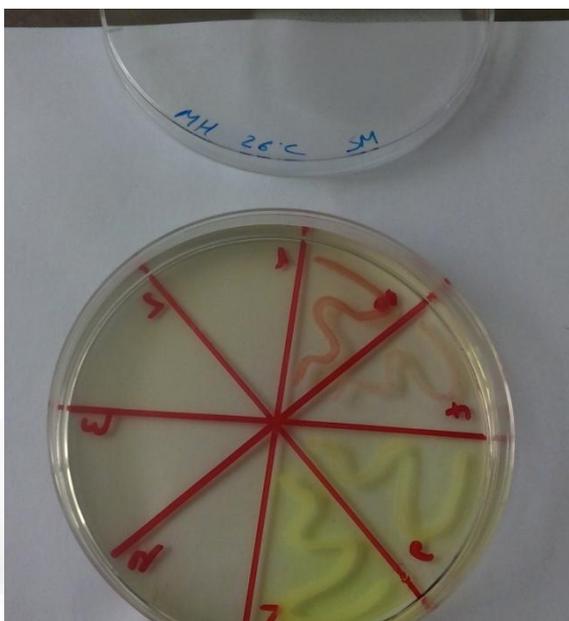
Con el objetivo de verificar los resultados anteriores se tomo la decisión de realizar un nuevo ensayo, pasando los resultados dudosos a placas.

4.3 MIC en placas

4.3.1 Mueller-Hinton 26°C

Serratia marcescens

En la figura 33 podemos observar su actividad.



Podemos comprobar cómo la bacteria tiene crecimiento en las 5 primeras concentraciones, es decir, que la MIC en Mueller-Hinton para *Serratia marcescens* es de 1,25 µl/mL.

Figura 33. *Serratia marcescens* en medio Mueller-Hinton a 26°C

Leuconostoc carnosum

En la figura 34 podemos observar su actividad.



Podemos observar cómo la actividad de la bacteria empieza como en el caso anterior en la concentración 5, es decir, que la MIC en Mueller-Hinton para *Leuconostoc carnosum* es de 1,25 µl/mL.

Figura 34. *Leuconostoc carnosum* en medio Mueller-Hinton a 26°C

Pseudomonas fragi

En la figura 35 podemos observar su actividad



Ocurre lo mismo que en los casos anteriores: la actividad de la bacteria empieza con la concentración 5, es decir, que la MIC en Mueller-Hinton para *Pseudomonas fragi* es de 1,25 $\mu\text{l}/\text{mL}$.

Figura 35. *Pseudomonas fragi* en medio Mueller-Hinton a 26°C

Pseudomonas fluorescens

En la figura 36 podemos observar su actividad

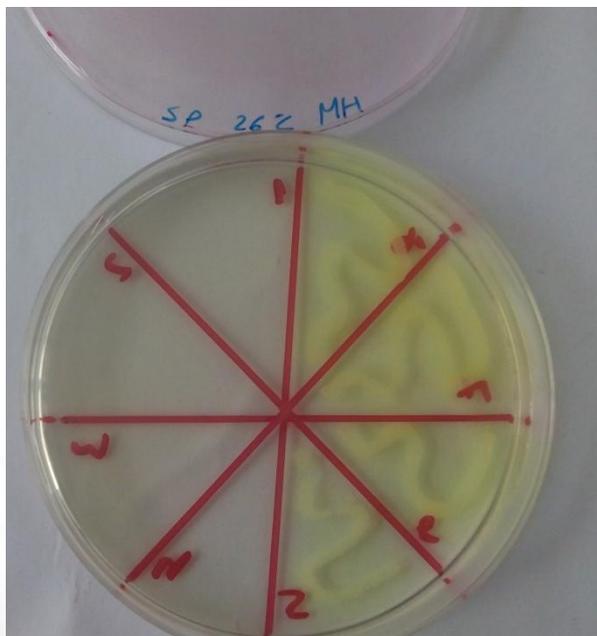


Ocurre lo mismo que en los casos anteriores: la actividad de la bacteria empieza en la concentración 5, es decir, que la MIC en Mueller-Hinton para *Pseudomonas fluorescens* es de 1,25 $\mu\text{l}/\text{mL}$.

Figura 36. *Pseudomonas fluorescens* en medio Mueller-Hinton a 26°C

Shewanella putrefaciens

En la figura 37 podemos observar su actividad



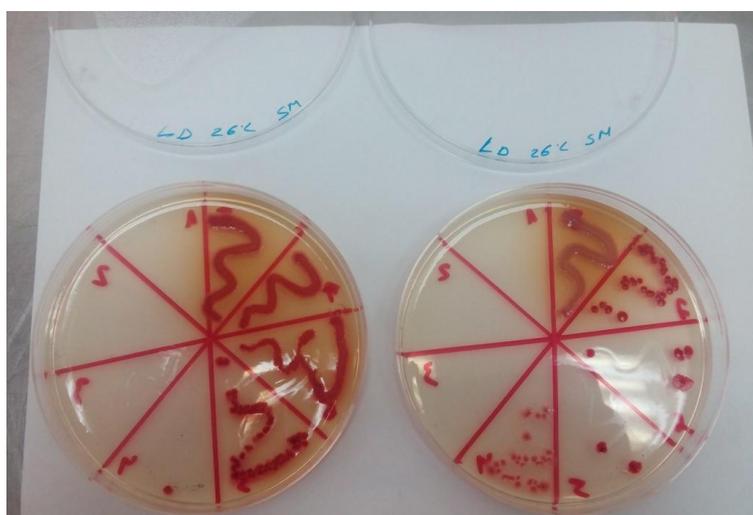
Ocurre lo mismo que en los casos anteriores: la actividad de la bacteria en a concentración 5, es decir, que la MIC en Mueller-Hinton para *Shewanella putrefaciens* es de 1,25 μL .

Figura 37. *Shewanella putrefaciens* en medio Mueller-Hinton a 26°C

4.3.2 Leche desnatada 26°C

Serratia marcescens

En la figura 38 podemos observar su actividad



Podemos comprobar cómo la actividad de la bacteria empezó a la concentración 4, es decir, que la MIC para *Serratia marcescens* en leche desnatada es de 2,5 μL .

Figura 38. *Shewanella putrefaciens* en leche desnatada a 26°C

Leuconostoc carnosum

En la figura 39 podemos observar su actividad



La actividad de la bacteria empieza a concentración 6, es decir, que la MIC para *Leuconostoc carnosum* en leche desnatada es de 0,625 $\mu\text{l}/\text{mL}$.

Figura 39 *Leuconostoc carnosum* en leche desnatada a 26°C.

Pseudomonas fragi

En la figura 40 podemos observar su actividad



La actividad de la bacteria empieza a concentración 5, es decir, que la MIC para *Pseudomonas fragi* en leche desnatada es de 1,25 $\mu\text{l}/\text{mL}$.

Figura 40 *Pseudomonas fragi* en leche desnatada.

Pseudomonas fluorescens

En la figura 41 podemos observar su actividad



La actividad de la bacteria empieza a concentración 5, por lo tanto, la MIC para *Pseudomonas fluorescens* en leche desnatada es de 1,25 $\mu\text{l/mL}$.

Figura 41. *Pseudomonas fluorescens* en leche desnatada a 26°C.

Shewanella putrefaciens

En la figura 42 podemos observar su actividad



La actividad de la bacteria empieza a concentración 6, por lo tanto, la MIC para en *Shewanella putrefaciens* en leche desnatada es de 1,25 $\mu\text{l/mL}$.

Figura 42. *Shewanella putrefaciens* en leche desnatada a 26°C.

4.3.3 Leche entera 26°C

Serratia marcescens

En la figura 43 podemos observar su actividad



Podemos observar como el aceite esencial solo es efectivo en la máxima concentración de nuestro estudio, por ello, la MIC para *Serratia marcescens* en leche entera es de 20 µl/mL

Figura 43. *Serratia marcescens* en leche entera a 26°C.

Pseudomonas fragi

En la figura 44 podemos observar su actividad



Podemos observar como la bacteria tiene actividad en todas las concentraciones ensayadas, por ello, la MIC para *Pseudomonas fragi* en leche entera es de 20 µl/mL

Figura 44. *Pseudomonas fragi* en leche entera a 26°C.

Pseudomonas fluorescens

En la figura 45 podemos observar su actividad



Podemos observar como la bacteria tiene actividad en todas las concentraciones ensayadas, por ello, la MIC para *Pseudomonas fluorescens* en leche entera es de 20 μL

Figura 45. *Pseudomonas fluorescens* en leche entera a 26°C.

Shewanella putrefaciens

En la figura 46 podemos observar su actividad

Figura 46. *Shewanella putrefaciens* en leche entera a 26°C.



Podemos observar como la bacteria tiene actividad en todas las concentraciones ensayadas, por ello, la MIC para *Shewanella putrefaciens* en leche entera es de 20 μL

En las siguientes tablas (21 y 22) podemos observar un resumen de los resultados anteriores:

Tabla 21. Cuadro resumen para bacterias de 26°C.

	MIC en µl/mL		
	Mueller-Hinton	Leche desnatada	Leche entera
<i>Pseudomonas fragi</i>	1,25	1,25	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,25	1,25	20
<i>Leuconostoc carnosum</i>	1,25	0,625	No inhibición
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1,25	1,25	20
<i>Serratia marcescens</i>	1,25	2,5	20

Tabla 22. Cuadro resumen para bacterias de 37°C.

	MIC en µl/mL		
	Mueller-Hinton	Leche desnatada	Leche entera
<i>Listeria innocua</i>	0,3125	2,50	2,50
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,625	1,25	10,00
<i>Escherichia coli</i>	0,3125	1,25	5,00
<i>Achromobacter denitrificans</i>	0,3125	1,25	20,00
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,3125	1,25	20,00

En cuanto a los resultados MIC vemos que los datos obtenidos son similares al estudio hecho por S.Bouhdidm et al. (2008) quienes también evaluaron la actividad antibacteriana del aceites esencial *Oreganum compactum* con una concentración de 50 µl frente a diferentes bacterias sus resultados fueron: *Escherichia coli* 0,0625, *Listeria innocua* 0,0312 y *Pseudomonas fluorescens* 0,25.

En un estudio realizado por Fadila Moussaoui et al. (2015) muestra que el aceite esencial *O.compactum* también tiene efecto inhibidor contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mirabilis* y *Pseudomonas putida*.

Por último, podemos decir que el aceite esencial *Oreganum compactum* tiene efecto antibacteriano en las 10 cepas ensayadas mostrando ser un fuerte bacteriocida en cultivo puro, siendo menor su actividad en el alimento. A partir de los diámetros de la zona inhibitoria podemos observar que el aceite es activo en todas las bacterias ensayadas siendo *Listeria innocua* la cepa con mayor resistencia frente al aceite esencial. Cabe destacar que esta actividad varía según el tipo de bacteria, siendo gram positivas más sensible al aceite esencial que las gram negativas, mostrando resultados muy similares al estudio realizado por Wan *et al.*, (1998) el cual también obtuvo la misma diferencia entre las cepas.

La resistencia de las bacterias gram negativas por los aceites esenciales se atribuye a su membrana externa de naturaleza hidrófila capaz de bloquear la penetración de compuestos hidrófobos en la membrana de la bacteria (Inouye *et al.*, 2001). La mayor actividad antibacteriana está relacionada con el contenido de carvacrol y timol del aceite esencial, ya que estos compuestos forman parte de los agentes antibacterianos naturales más eficientes (Nazer *et al.*, 2005).

Varios estudios demuestran que el carvacrol y el timol tienen actividad antibacteriana (Valero *et al.*, 2005), carvacrol tiene el poder de desestabilizar la membrana citoplasmática y actuar como un intercambiador de protones, de esta forma reduce el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, lo que tiene como resultado el colapso de protones y por consiguiente el agotamiento de ATP, conduciendo por último a la muerte celular (Ultee *et al.*, 2002).

Por otra parte, existen estudios nos informan que aceites esenciales ricos en componentes fenólicos poseen una gran actividad antimicrobiana, pero los componentes presentes en proporciones mayores no son los responsables de dicha actividad, la participación de componentes menos abundantes es un factor determinante para la acción del aceite esencial (Cimanga *et al.*, 2002), por lo tanto, en nuestro aceite esencial *Oreganum compactum* podemos atribuir esta actividad a la presencia de componentes como el p-cinamo, linalol y el y-pinemo entre otros, que también poseen efecto antibacteriano (Sonbolia *et al.*, 2006).

5. CONCLUSIONES

El AE de *O.compactum* muestra una gran efectividad antimicrobiana en las bacterias de ensayo sobre todo en el medio de cultivo, pero la actividad se ve afectada en presencia de la leche desnatada, especialmente en leche entera. Lo que significa que la matriz alimentaria, más compleja que el medio de cultivo, tiene un efecto protector sobre las bacterias frente a la acción de nuestro aceite esencial, en particular la presencia de grasa protege a las bacterias estudiadas.

Las cantidades recomendadas de El AE de *O.compactum* para futuras aplicaciones en productos lácteos desnatados para la inhibición de cada cepa estudiada es de 1,25 $\mu\text{l/mL}$ para *Pseudomonas fragi*, *Shewanella putrefaciens*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Achromobacter denitrificans*, *Alcaligenes faecalis* y, 2,5 $\mu\text{l/mL}$ para *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc carnosum* y *Listeria innocua* por último 5 $\mu\text{l/mL}$ para *Serratia marcescens*. Como ya hemos comentado para productos lácteos con 3,6% de grasa lácteos enteros la actividad del aceite esencial es menor, por lo tanto, se requieren cantidades mayores de este necesitando 20 $\mu\text{l/mL}$ para *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc carnosum*, *Shewanella putrefaciens*, *Serratia marcescens*, *Achromobacter denitrificans* y *Alcaligenes faecalis*, 10 $\mu\text{l/mL}$ para *Enterococcus faecalis*, 5 $\mu\text{l/mL}$ *Escherichia coli* y, por último, 2,5 $\mu\text{l/mL}$ para *Listeria innocua*.

Es necesario conocer esta limitación a la capacidad antimicrobiana del aceite esencial a causa de la matriz del alimento para poder formular productos seguros, en este caso se tendría que explorar el uso combinado con otros inhibidores, o el uso combinado de otras tecnologías para asegurar la calidad microbiológica de los alimentos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALBADO PLAUS EMILIA, SAEZ FLORES GLORIA, GRABIEL ATAUUCUSI SANDRA. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Oreganum vulgare* (orégano). Rev.Med Hered. 2001 p.16-19
- BAKKALI F. AVERBECK. S. AVERBECK D. IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46 .2008.p. 446–475.
- BOUCHRA CHEBLI, ACHOURI MOHAMED, IDRISSE HASSANI L.M., HMAMOUCHE MOHAMED. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. Journal of Ethnopharmacology .2003.p.165–169.

<http://www.sciencedirect.com/publicaciones.umh.es:8080/science/article/pii/S0378874103002757>

- BOUHDID, S, SKALI, S. N, IDAOMAR, M, ZHIRI, A, BAUDOUX, D, AMENSOUR, M. y ABRINI, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Oreganum compactum* essential oil. African Journal of Biotechnology. 2008. Vol. 7, p. 1563-1570.

<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58723>

- CHANG-HO KANG, YUJIN SHIN, HANEUL JEON, JAE-HO CHOI, SUYEON JEONG, JAE-SEONG SO. Antibiotic resistance of *Shewanella putrefaciens* isolated from shellfish collected from the West Sea in Korea. Marine Pollution Bulletin 76. 2013. p. 85–88.
- DEL VALLE PILAR, ROSARIO GARCÍA-ARRESTO MARÍA, DE ARRIAGA DOLORES, GONZALEZ-DONQUILES CARMEN, RODRÍGUEZ-FERNANDEZ PABLO, RÚA JAVIER. Antimicrobial activity of kaempferol and resveratrol in binary combinations with parabens or propyl gallate against *Enterococcus faecalis*. Food Control. 2015. p.213-220

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515302231>

- DESSÌ A, PUDDU M, TESTA M, MARCIALIS MA, PINTUS MC, FANOS V. *Serratia marcescens* infections and outbreaks in neonatal intensive care units. J Chemother 2009.p. 493-499.
- ERCOLINI DANILO, CASABURI ANNALISA, NASI ANTONELLA, FERROCINO ILARIO, DI MONACO ROSSELLA, FERRANTI PASQUALE, MAURIELLO GIANLUIGI, VILLANI FRANCESCO. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall

behavior as meat spoilers. International Journal of Food Microbiology 142. 2010. p.120–131.

- GALLEGOS JANNETH, ARRIETA GERMÁN, MÁTTAR SALIM, POUTOU RAÚL, TRESPALACIOS ALBA, CARRASCAL ANA. Frequency of *Listeria* spp. in coastal Colombian cheeses. Revista MVZ Córdoba.2012. p. 996-2007
- HAMDY A.E. SHAABAN, AHMED H. EL-GHORAB y TAKAYUKI SHIBAMOTO. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components. The Journal of Essential Oil Research Vol. 24.2012. p.203–212.

<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2012.659528>

- HEJAZI and FALKINER F. R. *Serratia marcescens*. J. Med. Microbiol. Vol. 46. 1997. p. 903-912.
- HYLDGAARD MORTEN, MYGIND TINA y LOUISE MEYER RIKKE. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. 2012.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265747/>

- JEANNOT VALERIE, CHAHBOUN JAMAL, RUSSEL DIANE y CASABIANCA . Composition of the hydrolat aromatic fraction, comparison with the essential oil and its interest in aromatherapy. The international journal of aromatherapy.2003. p.90-91.
- MANUEL MARTÍNEZ-GARCÍA PEDRO, RUANO-ROSA DAVID, SCHILIRÒ ELISABETTA, PRIETO PILAR, CAYO RAMON, RODRÍGUEZ-PALENZUELA PABLO y MERCADO-BLANCO JESÚS. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahlia*. Standards in Genomic Sciences. 2015.

<http://www.standardsingenomics.com/content/10/1/10>

- MENG JIANGHONG, T.LEJEUNE JEFFREY, ZHAO TONG, P. DOYLE MICHAEL. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 4th Ed. 2013. p. 287-290.
- MIRACLE CLARA BELDA-GALBIS, ANTONIO JIMÉNEZ-CARRETON, CONSUELO PINA-PEREZ MARÍA, MARTÍNEZ ANTONIO, RODRIGO DOLORES. Antimicrobial activity of açai against *Listeria innocua*. Food Control. 2015-p. 212-216.

- MUÑOZ LUIS, VÉLEZ JORGE, MOLANO DANIEL, SUSUNAGA PAOLA y GÓMEZ MARIO. Seudoquiste pancreático infectado por *Shewanella putrefaciens*: reporte de caso. *Infectio*. 2015. p.179-182.
- OUSSALA MOUNIA, CAILLET STEPHANE, SAUCIER LINDA, LACROIX MONIQUE. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science* 73.2006. p.236–244.
- PARRA CESAR. Control ecológico de levaduras alterantes en productos lácteos: ensayo de aceite esencial de *Oreganum compactum*. TFM. 2014.
- PHILLIP.S. COBURN, ARTO S. BAGHDAYAN , NIKKI CRAIG, ADAM BURROUGHS , PREETI TENDOLKAR, KRIS MILLER , FARES Z. NAJAR, BRUCE . ROE, NATHAN SHANKAR. A novel conjugative plasmid from *Enterococcus faecalis* E99 enhances resistance to ultraviolet radiation. *Plasmid*. 2010. p.18–25.
- SEONG-HYEUK NAM. AERI KIM, SANG-HAENG CHOI, ARAM KANG, DONG-WOOK KIM, RYONG NAM KIM, DAE-SOO KIM, y HONG-SEOG PARK. Genome Sequence of *Leuconostoc carnosum* KCTC 3525. *Journal of Bacteriology*.2011. p. 6100–6101

<http://jb.asm.org/content/193/21/6100.short>
- SILVA-ANGULO A.B, S.F. ZANINI B, A. ROSENTHAL C, D. RODRIGO D, G. KLEIN E, A. MARTÍNEZ D. Combined effect of carvacrol and citral on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* and on the occurrence of damaged cells. *Food Control* 53. 2015. p.156-162.
- VIUDA-MARTOS M., RUIZ-NAVAJAS Y., FERNANDEZ-LOPEZ J., PEREZ-ALVAREZ J.. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *Food Control* 19. 2008. p. 1130–1138.
- VOGEL BIRTE FONNESBECH, MASATAKA SATOMI, y LONE GRAM. Identification of *Shewanella baltica* as the Most Important H₂S-Producing Species during Iced Storage of Danish Marine Fish. *Appl Environ Microbiol*. 2005. p. 6689–6697

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287644/>
- WIEDMANN MARTIN, WEILMEIER DENISE, DINEEN SEAN S., RALYEA ROBERT, y J. BOOR KATHRYN. Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from Milk. *Applied and environmental microbiology*.2000. p. 2085–2095.

