

Estudio transcriptómico del efecto inhibitorio de aceites esenciales de plantas aromáticas sobre el *quorum sensing* y la formación de *biofilm* por *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis y

Pseudomonas aeruginosa

Lady Caterine Martínez Álvarez

Trabajo de Grado para Optar el título de Magister en Microbiología

Director

German Alexis Zafra Sierra

Doctor en Ciencias en Biotecnología

Codirectora

Claudia Cristina Ortiz López

Doctora en Biocatálisis

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2020

Agradecimientos

Primero agradezco a Dios por otorgarme esta oportunidad.

En segundo lugar a mis padres y hermano; por sus consejos, paciencia y apoyo incondicional...amigos infalibles... son los pilares de mi vida, por lo cual deseo ser la base de la suya.

A los angeles que se fueron y nos ven desde el cielo, son testigos fieles de los esfuerzos y sacrificios... este logro lo comparto con ellos...su familia es mi familia.

En tercer lugar, se encuentran mis amigos... aquellos que me han acompañado desde hace corto y largo tiempo, porque incluso a la distancia me brindaron su compañía, consejos, paciencia y ayuda en momentos de dificultad... demostrandome el verdadero significado de la amistad.

Tambien quiero agradecer a los miembros del grupo de investigación y profesores de la Universidad, que permitieron resolver las dudas que se presentaban durante el camino.

Finalmente, a mis directores por su paciencia y colaboración durante el desarrollo de este trabajo de grado.

IV-VIII-MMXX

L.C.M.A

Contenido

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO CONCEPTUAL	20
1.1 Aceites Esenciales y su actividad biológica.....	20
1.2 <i>Quorum sensing</i> como mecanismo de formación de <i>biofilm</i>	21
1.3 <i>Biofilm</i>	24
1.4 Farmacorresistencia del <i>biofilm</i>	26
1.5 <i>QS</i> y <i>biofilm</i> en <i>P. aeruginosa</i>	27
1.6 <i>QS</i> y <i>biofilm</i> en <i>S. Enteritidis</i>	29
1.7 Transcriptómica	30
2. ESTADO DEL ARTE	31
2.1 AE como agentes antimicrobianos.....	31
2.2 Genes implicados en la formación <i>biofilm</i> de <i>S. Enteritidis</i> y <i>P. aeruginosa</i>	35
2.3 Transcriptómica como herramienta para la evaluación del efecto de un AE sobre los microorganismos.....	38
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	42
5. HIPÓTESIS	43

6. OBJETIVOS	43
6.1 Objetivo General	43
6.2 Objetivos Específicos.....	43
7. MATERIALES Y MÉTODOS	44
7.1 Cepas bacterianas.....	44
7.2 AE evaluados	44
7.3 Selección de medios de cultivo para bacterias en estado planctónico y sésil.....	45
7.4 Selección del AE con mayor efecto antimicrobiano e inhibitorio del <i>QS</i> y formación de <i>biofilm</i>	46
7.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de AE	46
7.4.2 Evaluación de la inhibición de formación de <i>biofilm</i> por los AE con mayor actividad antimicrobiana.....	47
7.4.3 Evaluación de la inhibición del <i>QS</i> por el AE con mayor actividad antimicrobiana y anti- <i>biofilm</i>	48
7.5 Formación e inhibición de <i>biofilm</i> por el AE seleccionado en biorreactores de 50 mL.....	49
7.6 Extracción de ARN y secuenciación masiva de transcritos.....	51
7.7 Análisis bioinformático.....	52
7.7.1 Control de calidad de las secuencias crudas.....	52
7.7.2 Análisis de perfiles transcriptómicos mediante MG-RAST	53
7.7.3 Multiensamblaje y análisis de expresión diferencial mediante bioconductor.....	54
7.7.4 Mapeo de rutas metabólicas	55
7.8 Análisis estadístico.....	55
7.9 Resumen de la metodología	56

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
8.1 Composición de los AE evaluados	57
8.2 Selección de medios de cultivo.....	59
8.3 Selección del AE con mayor actividad antimicrobiana	63
8.4 Evaluación de la inhibición de la formación de <i>biofilm</i> de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. Enteritidis</i> frente a <i>LO</i> Timol-Carvacrol II y <i>Thymus vulgaris</i>	67
8.5 Evaluación de la inhibición del AE de <i>LO</i> Timol-Carvacrol II sobre el <i>QS</i> de <i>C. violaceum</i> CV 026.....	69
8.6 Formación e inhibición de <i>biofilm</i> de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. Enteritidis</i> frente a <i>LO</i> Timol-Carvacrol II en biorreactores de 50 ml	73
8.7 Extracción de ARN y secuenciación masiva de transcritos.....	76
8.8 Construcción de librerías y secuenciación masiva de transcritos	78
8.9 Control de calidad de las secuencias generadas.....	80
8.10 Diferencias generales en perfiles transcriptómicos en respuesta al tratamiento con el AE..	81
8.11 Expresión diferencial de genes en respuesta al tratamiento con el AE sobre <i>P. aeruginosa</i>	83
8.12 Expresión diferencial de genes en respuesta al tratamiento con el AE sobre <i>S. Enteritidis</i> .	85
8.13 Rutas metabólicas afectadas por el tratamiento de <i>LO</i> Timol-Carvacrol II sobre <i>P. aeruginosa</i>	88
8.14 Rutas metabólicas afectadas por el tratamiento de <i>LO</i> Timol-Carvacrol II sobre <i>S. Enteritidis</i>	93
8.15 Posibles mecanismos de acción del AE de <i>LO</i> Timol-Carvacrol II sobre el <i>biofilm</i> de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. Enteritidis</i>	98
9. CONCLUSIONES.....	102

10. RECOMENDACIONES 104

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 105

APÉNDICES 126

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Mecanismos de señalización asociados a QS: A. Bacterias Gram negativas: <i>LuxI/LuxR</i> . AHL como molécula señal; B. Bacterias Gram positivas: oligopéptidos de dos componentes, pequeños péptidos como molécula señal que activan cascadas de fosforilación; C. Gram negativas y Gram postivas: <i>LuxS/Lsr</i> con diéster de furonasil borato como molécula señal	23
Figura 2. Proceso de formación de <i>biofilm</i> : El desarrollo implica cuatro etapas. I. Adherencia; II. Formación de microcolonias; III. Maduración de <i>biofilm</i> con formación de macrocolonias y IV. Dispersión. Se observan algunos componentes que favorecen los procesos de resistencia a múltiples fármacos: ADN extracelular, plásmidos, bacteriófagos y exopolicáridos.	26
Figura 3. Diseño del biorreactor de 50 ml para la obtención de biomasa bacteriana	51
Figura 4. Descripción general de la metodología	56
Figura 5. Cinética de crecimiento en estado planctónico de <i>P. aeruginosa</i> , en medios RPMI, BHI, M63, TSB, MH y LB (Agitación orbital 230rpm, 37°C).....	59
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>S. Enteritidis</i> en medios RPMI, BHI, M63, MH y LB (Agitación orbital 230rpm, 37°C).....	60
Figura 7. .Evaluación de la formación de <i>biofilm</i> de <i>P. aeruginosa</i> en microplacas de PVC usando diferentes medios de cultivo (Técnica de cristal violeta, 37°C, 24h)	61
Figura 8. Evaluación de la formación de <i>biofilm</i> de <i>S. Enteritidis</i> en microplacas de PVC usando diferentes medios de cultivo (Técnica de cristal violeta, 37°C, 24h)	61

Figura 9. Actividad antimicrobiana de <i>LO</i> Timol-Carvacrol II sobre <i>C. violaceum</i> CV 026, cultivada en medio líquido LB, en condiciones aerobias, a temperatura ambiente y agitación orbital de 150 rpm durante 24h.	71
Figura 10. Proceso de inhibición de la producción de violaceína por el AE sobre <i>C. violaceum</i> CV 026. Modificado de Duran et al., 2016.	72
Figura 11. Evaluación de la formación e inhibición de biofilm de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. Enteritidis</i> en biorreactores de 50 mL, con burbujeo a 37°C. B: células en estado de biofilm; INC: Incontable.	75
Figura 12. Actividad antibiofilm de <i>LO</i> Timol-Carvacrol II evaluada por medio de SEM. (Aumento 8.000X). (A). <i>S. Enteritidis</i> sin tratamiento; (B). <i>S. Enteritidis</i> con tratamiento; (C.) <i>P. aeruginosa</i> sin tratamiento y (D.) <i>P. aeruginosa</i> con tratamiento.	76
Figura 13. Corrido electroforético de muestras de ARN	77
Figura 14. Porcentajes de abundancia de las secuencias en (a) <i>S. Enteritidis</i> y (b) <i>P. aeruginosa</i> con y sin tratamiento de AE, relacionadas con las principales rutas metabólicas de la ortología KEGG.	82
Figura 15. Volcano plot de <i>P. aeruginosa</i> que representa la comparación en la expresión de genes de células con y sin tratamiento de AE, con un FDR <0.05.	85
Figura 16. Volcano plot de <i>S. Enteritidis</i> que representa la comparación en la expresión de genes de células con y sin tratamiento de AE, con un FDR <0.05.	88
Figura 17. Efecto del AE sobre la expresión de genes de las rutas de metabolismo de Alanina, Aspartato y Glutamato en <i>P. aeruginosa</i>	90
Figura 18. Efecto del AE sobre la expresión de genes en la vía de la fosforilación oxidativa en <i>S. Enteritidis</i>	95

Figura 19. Posibles mecanismos efectores del AE de LO Timol - Carvacrol II sobre el <i>biofilm</i> de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. Enteritidis</i>	100
Figura 20. Posibles mecanismos efectores del AE de LO Timol - Carvacrol II sobre el <i>biofilm</i> de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. Enteritidis</i> a nivel de rutas metabólicas.	101

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Compuestos de AE con actividad antimicrobiana obtenidos a partir de plantas	32
Tabla 2. Mecanismos de acción conocidos de AE sobre diferentes bacterias patógenas	33
Tabla 3. Genes involucrados durante la formación de <i>biofilm</i> o farmacorresistencia para <i>Salmonella enterica</i> serovariedad Enteritidis y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Tabla 4. Composición química de los componentes mayoritarios de los AE empleados.....	57
Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los 11 AE evaluados a diferentes concentraciones en microplacas de fondo plano y agitación orbital a 230rpm, 37°C.....	64
Tabla 6. Actividad anti- <i>biofilm</i> de los AE con mayor actividad antimicrobiana frente a <i>P. aeruginosa</i> cultivada en medio LB y <i>S. Enteritidis</i> en medio M63, a 37°C durante 24h.....	69
Tabla 7. Evaluación del efecto del AE de <i>LO</i> Timol-Carvacrol II sobre el crecimiento de <i>C. violaceum</i> CV026.....	70
Tabla 8. Promedio de las concentraciones de ARN obtenidas por medio del proceso de extracción.....	78
Tabla 9. Estadísticas de las librerías de ARN.....	79
Tabla 10. Resultados del proceso de secuenciación masiva de librerías de ARN.....	79
Tabla 11. Principales genes afectados por el tratamiento de <i>LO</i> quimiotipo Timol-Carvacrol II sobre el <i>biofilm</i> de <i>P. aeruginosa</i> . y rutas metabólicas a los cuales se encuentran vinculados....	92

Tabla 12. Principales genes afectados por el tratamiento de *LO* quimiotipo Timol-Carvacrol II sobre el *biofilm* de *S. Enteritidis* y rutas metabólicas a los cuales se encuentran vinculados..... 96

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Biomasa de células en estado planctónico y de <i>biofilm</i> de (a) <i>P. aeruginosa</i> y (b) <i>S. Enteritidis</i> para el proceso de extracción de ARN.	126
Apéndice B. Genes expresados diferencialmente en respuesta al tratamiento con <i>LO</i> quimiotipo Timol-Carvacrol II sobre del <i>biofilm</i> de <i>P. aeruginosa</i>	126
Apéndice C. Genes expresados diferencialmente en respuesta al tratamiento con lo quimiotipo Timol-Carvacrol II sobre del <i>biofilm</i> de <i>S. Enteritidis</i>	131

Glosario

Aceite esencial (AE): producto obtenido de la materia prima vegetal, ya sea por destilación con agua o vapor, o del epicarpio de cítricos por un proceso mecánico, o por destilación en seco.

AHL: las lactonas de N- acilhomoserina son la familia de moléculas de señalización más investigada que participan en la comunicación de célula a célula bacteriana (detección de *quórum*). Las moléculas de señalización producidas por las bacterias se liberan al medio ambiente, y su concentración ambiental resultante depende de la densidad de la población; Una vez que la densidad de población ha alcanzado un valor umbral, se modula la expresión del gen bacteriano.

Biofilm: comprende cualquier consorcio sintrófico de microorganismos en el que las células se adhieren entre sí y a menudo también a una superficie. Estas células adherentes se incrustan dentro de una matriz extracelular viscosa que está compuesta de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

Farmacorresistencia: la resistencia a los antimicrobianos es la capacidad que tienen los microorganismos (como bacterias, virus y algunos parásitos) de impedir que los antimicrobianos (como antibióticos, antivíricos y antipalúdicos) actúen contra ellos. En consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas.

Quorum quenching: se refiere al mecanismo por el cual se puede interrumpir la comunicación bacteriana.

Quorum sensing: la detección de quórum (*QS*) es el proceso por el cual las bacterias se comunican entre sí a través de pequeñas moléculas de señalización como las lactonas de N-acilhomoserina (AHL).

Secuenciación: la secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

Transcriptómica: la Transcriptómica es el estudio del conjunto de ARN (ARNr, ARNt, ARNm, ARNi, miARN) que existe en una célula, tejido u órgano.

Resumen

Título: Estudio transcriptómico del efecto inhibitorio de aceites esenciales de plantas aromáticas sobre el *Quorum Sensing* y la formación de *Biofilm* por *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis y *Pseudomonas aeruginosa**

Autor: Lady Caterine Martínez Alvarez**

Palabras Clave: *Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Biofilm*, *Quorum sensing*

En los últimos años ha crecido el interés por investigar y desarrollar nuevos agentes antimicrobianos para combatir la farmacorresistencia, debido a que los mecanismos de acción de los antibióticos convencionales no están siendo efectivos. En este contexto, se ha demostrado que diferentes Aceites Esenciales (AE) obtenidos de plantas vegetales, presentan actividad antibacteriana. Por lo tanto, resulta de interés determinar, si estos compuestos utilizan diferentes mecanismos de acción, tales como el efecto sobre rutas de señalización para la comunicación celular, como el *Quorum Sensing* (QS). El QS regula diversas funciones importantes en las bacterias, entre las cuales se encuentran la formación de *biofilm* y la resistencia a antibióticos. La inhibición de este tipo de comunicación celular, puede reducir la patogenicidad, la resistencia a los antibióticos y la formación de *biofilm* en microorganismos patógenos que generan infecciones persistentes. Por consiguiente, en el presente estudio se analizó el posible mecanismo de acción de un AE con actividad antimicrobiana, *anti-biofilm* y *anti QS*, sobre el perfil transcriptómico de *S. enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Para tal fin, se analizaron once AE suministrados por el CENIVAM, y se determinó que el obtenido a partir de *Lippia origanoides* Timol-Carvacrol II (LO Timol-Carvacrol II), presentó el mayor efecto antimicrobiano y *anti-biofilm* a una concentración de 0.75 mg/mL y *anti-quorum a sensing* a 0.3 mg/mL, sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Posteriormente, se evaluó el efecto del AE LO Timol-Carvacrol II sobre los perfiles transcriptómicos de los microorganismos evaluados. Los perfiles transcriptómicos de *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 en estado sésil, tratados con el AE de LO Timol-Carvacrol II, indicaron cambios significativos en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético, de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, procesamiento de información ambiental (sistemas de dos componentes y transportadores ABC) y proteínas de membrana. El análisis de los perfiles obtenidos, permitió identificar un aumento en la expresión de los genes que codifican para las acilasas de N-acil homoserina lactona (AHL) PvdQ y QuiP, al igual que una disminución en la expresión del gen luxR que funciona como activador transcripcional durante la síntesis del autoinductor, lo que permitiría un bloqueo del sistema de comunicación celular tipo QS en los microorganismos. Por otra parte, se generó una disminución en la expresión de los genes *bdcA*, *ycbT*, *cheY* y *bdIA*, relacionados con mecanismos de motilidad bacteriana y *bztD*, *livG*, *aapJ*, *bztA*, *yejA*, *araF*, *araH*, *msbA*, *modB*, *potI*, *pstS* y *yddA* vinculados al transporte de membrana, lo cual llevaría a una disminución en los procesos de adherencia y formación de *biofilm*. Finalmente, los resultados obtenidos en el presente estudio podrán servir como base para el desarrollo de nuevos trabajos, enfocados en la determinación de dianas terapéuticas y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología y bioanálisis. Director: German A. Zafra. Codirectora: Claudia C. Ortiz.

Abstract

Title: Transcriptomic study of the inhibitory effect of essential oils or aromatic plants extracts on quorum sensing and the formation of Biofilm by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and *Pseudomonas aeruginosa**

Author: Lady Caterine Martínez Alvarez**

Key Words: *Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Quorum sensing

In recent years, interest in the research and development of new antimicrobial agents to combat drug resistance has grown, since the mechanisms of action of conventional antibiotics are not being effective. In this context, it has been shown that different Essential Oils (EO) obtained from vegetable plants, show antibacterial activity. Therefore, it is of interest to determine if these compounds use different mechanisms of action, such as the effect on signaling pathways for cellular communication, such as Quorum Sensing (QS). QS regulates various important functions in bacteria, including biofilm formation and antibiotic resistance. Inhibition of this type of cellular communication can reduce pathogenicity, resistance to antibiotics, and biofilm formation in pathogenic microorganisms that generate persistent infections. Therefore, in the present study the possible mechanism of action of an EO with antimicrobial, antibiofilm and anti QS activity was analyzed on the transcriptomic profile of *S. enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 and *P. aeruginosa* ATCC 27853. For this purpose, eleven EO supplied by CENIVAM, were analyzed, and it was determined that *Lippia origanoides* Timol-Carvacrol II (*LO* Timol-Carvacrol II), presented the highest antimicrobial and anti-biofilm effect at a concentration of 0.75 mg / mL and anti-QS at 0.3 mg / mL, on *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *P. aeruginosa* ATCC 27853. Subsequently, the effect of EO *LO* Timol-Carvacrol II on the transcriptomic profiles of this microorganisms was evaluated. The transcriptomic profiles of *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 in sessile state, treated with the EO of *LO* Timol-Carvacrol II, indicated significant changes in the expression of genes related to energy metabolism, of amino acids, carbohydrates, lipids, environmental information processing (two-component systems and ABC transporters) and membrane proteins. The analysis of the obtained profiles allowed us to identify an increase in the expression of the genes that encode the N-acyl homoserine lactone (AHL) acylases PvdQ and QuiP, and a decrease in the expression of luxR gene that works as an activator. transcriptional during autoinducer synthesis, which would allow a blockage of the QS cellular communication system in the microorganisms. On the other hand, a decrease in the expression of the *bdcA*, *ycbFT*, *cheY* and *bdIA* genes was generated, related to bacterial motility mechanisms and *bztD*, *livG*, *aapJ*, *bztA*, *yejA*, *araF*; *araH*, *msbA*, *modB*, *potI*, *pstS* and *yddA* linked to membrane transport, which would lead to a decrease in the processes of adhesion and biofilm formation. Finally, the results obtained in this study may serve as the basis for the development of new works, focused on the determination of therapeutic targets and the development of new antimicrobial drugs.

* Degree work

** Faculty of Health. School of Microbiology and Bioanalysis. Director: German A. Zafra. Co-director: Claudia C. Ortiz.

Introducción

La frecuencia y el espectro de las infecciones generadas por bacterias resistentes a los antibióticos aumenta constantemente a causa de diversos factores, entre los cuales se destaca el crecimiento bacteriano en forma de *biofilm* (Bjarnsholt *et al.* , 2011; Khaledi *et al.*, 2016). Esta conformación celular, provee a las bacterias de una estabilidad genética y fenotípica que facilita la adhesión a superficies vivas o inertes y el desarrollo de mecanismos de resistencia antimicrobiana (Costerton & Balaban 2008; Caldas 2015; Sagar *et al.*, 2016; Algburi *et al.*, 2017; Sankar & Ravishankar 2018).

El proceso de formación del *biofilm* inicia mediante la adherencia de las bacterias a una superficie biótica o abiótica, posteriormente se inicia el crecimiento celular, la formación de microcolonias y la secreción de ExoPoliSacárido (EPS) (Bjarnsholt *et al.*, 2011). La composición del EPS varía según el tipo de microorganismo y las condiciones ambientales (Pandit *et al.*, 2017); por ejemplo, alginato en *Pseudomonas aeruginosa*, celulosa en *Salmonella Typhimurium*, glucosa y galactosa en *Vibrio cholerae* o poli-N-acetilglucosamina en *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte, durante la formación del *biofilm*, se encuentran involucrados diferentes mecanismos de comunicación celular, tal como el c-di-GMP, la cascada Gac / Rsm y el *Quorum Sensing* (QS). En el caso del QS, una concentración umbral de una sustancia química difusible (autoinductor) regula la expresión génica de la comunidad bacteriana (Mukherjee *et al.*, 2017).

Lo mencionado previamente puede favorecer los procesos de Resistencia Antimicrobiana (RAM, por sus siglas en inglés). Así mismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) indicó

que la RAM pone en riesgo la eficacia y tratamiento de infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos, lo cual se ve reflejado en el aumento de la tasa de mortalidad de los pacientes y en los costos médicos al prolongar las estancias hospitalarias (OMS, 2018a). El impacto en la salud pública pueden ser más grave cuando los microorganismos, además de ser resistentes a los antimicrobianos, poseen la capacidad de formar *biofilm* (Serenó *et al.*, 2017). Con el fin de desarrollar nuevos fármacos, durante el año 2017 la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios en la cual se evidencia la amenaza que representaban las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos; entre ellas se destacaron dos microorganismos formadores de *biofilm*: *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos con prioridad crítica, y *Salmonella* resistente a las fluoroquinolonas con prioridad elevada (OMS, 2017). Los datos publicados por la OMS fueron corroborados en el último reporte del Centro para Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) durante el año 2019, en el cual *P. aeruginosa* y *Salmonella* fueron clasificados como amenaza grave (CDC, 2019).

En el caso de *P. aeruginosa*, un patógeno oportunista formador de *biofilm*, es conocido por producir diversos factores de virulencia y ser responsable de 10-20% de las infecciones en hospitales, especialmente entre pacientes inmunocomprometidos (Rasamiravaka *et al.*, 2015; Skariyachan *et al.*, 2018). Una de las principales patologías a la que se asocia, es la infección pulmonar crónica en pacientes con fibrosis quística, en la cual las células bacterianas productoras de alginato que forman el *biofilm* en el pulmón, adquieren mayor tolerancia a los antibióticos y a la acción del sistema inmune del paciente (Høiby *et al.*, 2010).

Por otro lado, *S. enterica* es uno de los patógenos bacterianos intestinales más importantes transmitidos por los alimentos (Desin *et al.*, 2009). Sumado a ello, la capacidad de la bacteria de adherirse a diferentes tipos de superficies como metal, plástico y caucho; facilita la contaminación

cruzada y ha generado grandes pérdidas económicas en la industria alimentaria (Chin *et al.*, 2017; Dantas *et al.*, 2018; Iñiguez *et al.*, 2017).

En la actualidad son muchos los estudios que se están realizando para el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antimicrobiana. Entre ellos, se encuentran los Aceites Esenciales (AE) constituyendo una buena alternativa para disminuir la RAM. Actualmente, se conocen aproximadamente 3000 AE, 300 de los cuales son comercialmente importantes para las industrias farmacéutica, agronómica, alimentaria, sanitaria y cosmética. Estos constituyen mezclas naturales muy complejas que pueden contener entre 20 y 60 componentes a diferentes concentraciones (Bakkali *et al.*, 2008). Debido a que el uso de estos componentes naturales a nivel hospitalario es bajo, y su actividad no va dirigida a un blanco terapéutico específico, se ha demostrado que las bacterias han desarrollado menos resistencia frente a los mismos (Edwards *et al.*, 2004; García 2006; Swamy *et al.*, 2016).

Actualmente, más del 80% de la población mundial emplea medicamentos a base de plantas y el valor de estos productos en el mercado internacional se aproxima a los 62 mil millones de dólares. Así mismo, se estima que para el año 2050 este valor alcance alrededor de 5 billones de dólares; sumado a ello, más de 9000 plantas nativas han sido identificadas y registradas por sus propiedades curativas y más de 250 tipos de AE se comercializan en el mercado internacional con un valor de 1,2 mil millones de dólares (Swamy *et al.*, 2016).

Por lo descrito previamente, este estudio se enfocará en el análisis del posible mecanismo de acción de un AE con actividad antimicrobiana, *antibiofilm* y anti-QS, sobre el perfil transcriptómico de *S. enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

1. Marco conceptual

1.1 Aceites Esenciales y su actividad biológica

Como se mencionó previamente, los AE de plantas poseen diferentes actividades biológicas, lo cual ha permitido su uso como antiséptico y conservante de alimentos (Mancianti & Ebani, 2020). Los AE están compuestos principalmente de dos grupos de sustancias individuales: terpenoides (monoterpeno, sesquiterpeno y di-terpeno) y fenilpropanoides. El grupo terpenoide incluye varios compuestos, como p- cimeno, pineno, limoneno, sabineno y terpineno, geraniol, mentol, linalool, citronelol., carvona, timol, carvacrol, acetato de geranilo, acetato de eugenilo, geranial, neral y 1,8-cineol. Además, los fenilpropanoides incluyen varios compuestos aromáticos como el alcohol cinnamílico, el cinamaldehído, el eugenol y el cinamato de metilo (Camele *et al.*, 2019). Adicionalmente, el efecto que tienen los AE sobre los diferentes microorganismos está influenciado por varios parámetros que incluyen el tiempo de cosecha, el modo de extracción y la conservación del mismo (Mancianti & Ebani, 2020).

Diferentes estudios han corroborado la actividad de los AE sobre diferentes microorganismos patógenos como bacterias, hongos, virus y parásitos. Por ejemplo, la actividad del AE de *Clausena lausium* contra las levaduras de *Candida* (He *et al.*, 2019); del AE de carvacrol, citral y limoneno sobre *Staphylococcus aureus* (Berdejo *et al.*, 2019) o del AE de *Endlicheria bracteolata* sobre protozoos flagelados como *Leishmania amazonensis* (Rottini *et al.*, 2019).

Adicionalmente, se ha evidenciado que los AE pueden bloquear los mecanismos de comunicación celular de los microorganismos como el *QS* (Poli *et al.*, 2018), lo cual podría conducir a la disminución de las respuestas ambientales, como son los procesos de formación de *biofilm* y factores de virulencia de algunas especies bacterianas en respuesta al estrés del entorno celular (Camele *et al.*, 2019). Un ejemplo de lo mencionado, es el efecto del AE de Timol en la disminución de la formación de *biofilm* de *S. aureus* (Patsilinakos *et al.*, 2019), del AE *Origanum vulgare* sobre *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium y *S. aureus*, o de los AE de salvia, enebro, limón y mejorana sobre el *biofilm* de *Bacillus cereus*, *E. coli* y *Pichia anómala*. (Camele *et al.*, 2019).

1.2 *Quorum sensing* como mecanismo de formación de *biofilm*

El *QS* es un mecanismo de comunicación celular que les permite a las bacterias reconocer y controlar la densidad de la población bacteriana, detectando la acumulación de una molécula de señalización específica conocida como autoinductor (Mukherjee *et al.*, 2017). Cuando el autoinductor alcanza una concentración umbral se hace detectable para las bacterias e inicia la percepción del *quorum*; en respuesta, las células activan algunos genes que expresan funciones de manera cooperativa, facilitando la adaptación de las bacterias al entorno. Entre las funciones reguladas por el *QS* se encuentran: la formación de *biofilm*, la transferencia de plásmidos, la tolerancia a ácidos, la síntesis de antibióticos y factores de virulencia que se expresan cuando la concentración de la señal de *QS* alrededor de las células es suficientemente alta (Schluter *et al.*, 2017).

El *QS* regula la expresión génica en respuesta al tamaño de la población de células bacterianas y es la principal función responsable de los diferentes fenotipos bacterianos. Por ejemplo, el *QS* puede regular la mayoría de los metabolitos secundarios bioactivos bacterianos, como las toxinas, que pueden ser transmitidas al ser humano, a través de los alimentos. En otros casos, este tipo de comunicación celular también puede permitir la coordinación contra el huésped, como en el caso de las infecciones por *P.aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística (Camele *et al.*, 2019).

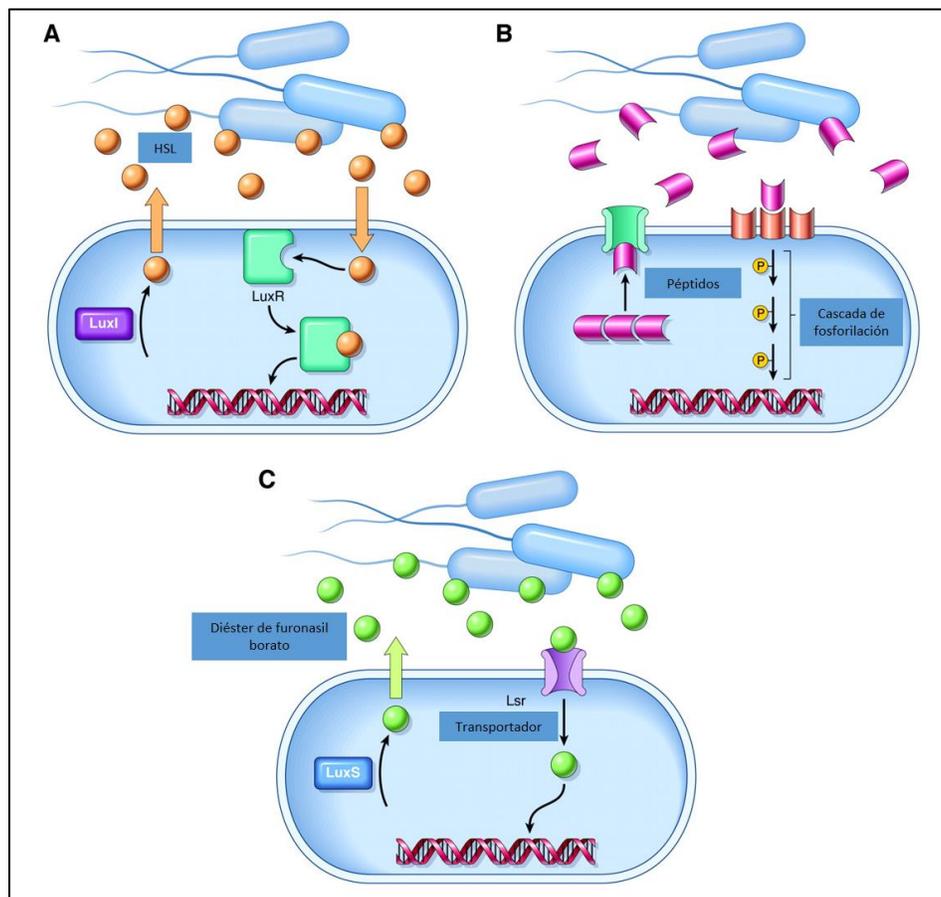
El sistema *QS* se basa en diferentes elementos clave, como autoinductores, señal sintasa, y receptores de autoinductores (Camele *et al.*, 2019). De esta forma, los mecanismos de señalización asociados a *QS* en bacterias se han clasificado en: (ver Figura 1): (i) tipo LuxI / LuxR, frecuente en bacterias Gram-negativas, en las cuales los sistemas reguladores de genes utilizan acil homoserina lactonas (AHL) como moléculas señal; (ii) sistemas basados en oligopéptidos de dos componentes, comunes en bacterias Gram-positivas, que usan péptidos pequeños como moléculas señal y (iii) sistemas basados en diéster de furanosil borato, presente en bacterias Gram negativas y Gram positivas; el sistema es sintetizado por los miembros de la familia de proteínas LuxS, en ambos tipos de bacterias (Caldas 2015; Basavaraju *et al.*, 2016; Papenfort *et al.*, 2017; Asfour 2017).

La dificultad para eliminar el *biofilm* y controlar el aumento de la resistencia a los antibióticos convencionales, requiere la búsqueda de nuevas alternativas para combatir los microorganismos patógenos. Por lo tanto, han ido tomando fuerza las investigaciones enfocadas en el sistema *QS*. La inhibición de este tipo de comunicación celular, puede reducir la patogenicidad, la resistencia a los antibióticos (Paluch *et al.*, 2020) y la formación de *biofilm* en

infecciones sistémicas y locales de diversos microorganismos patógenos que generan infecciones persistentes (Szabó *et al.*, 2009).

Figura 1.

Mecanismos de señalización asociados a QS: A. Bacterias Gram negativas: LuxI/LuxR. AHL como molécula señal; B. Bacterias Gram positivas: oligopéptidos de dos componentes, pequeños péptidos como molécula señal que activan cascadas de fosforilación; C. Gram negativas y Gram positivas: LuxS/Lsr con diéster de furonasil borato como molécula señal



Nota. Modificado de (Raffa *et al.*, 2005).

1.3 *Biofilm*

Como se enunció previamente, la formación de *biofilm* está altamente relacionada con la comunicación celular dependiente de *QS*, que adicionalmente juega un papel esencial en el desarrollo de la resistencia antimicrobiana y la producción de factores de virulencia (Camele *et al.*, 2019). El *biofilm* se define como una comunidad estructurada de células bacterianas, que se encuentran se encuentran en forma de comunidades adheridas a una superficie, mediante moléculas de adhesión y EPS (Costerton & Balaban, 2008). Microorganismos como *Salmonella spp.* y *P. aeruginosa* pueden vivir en estado planctónico o sésil (*biofilm*); El estado de *biofilm* le confiere ventajas a los microorganismos para la supervivencia, al desarrollar cooperación entre sí y capacidad de modificar el microambiente en el que se encuentran (Sagar *et al.*, 2016).

El proceso de formación del *biofilm* se realiza en cinco etapas principales (Figura 2): (i) Adherencia: las células bacterianas móviles se unen a una superficie de forma reversible mediante proteínas de superficie celular como adhesinas, flagelos y pilis (Ramírez *et al.*, 2014); (ii) Formación de microcolonias: las bacterias empiezan a dividirse formando microcolonias, lo que genera una adherencia irreversible con el subsecuente inicio de la producción de EPS (Römling & Balsalobre, 2012); (iii) Formación de la matriz (*biofilm* joven): secreción de componentes de la matriz tales como polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; estos favorecen la adhesión irreversible del *biofilm* y actúan como una barrera de difusión, que evita la penetración de cualquier tipo de sustancia que pueda afectar la integridad del agregado (Sagar *et al.*, 2016); (iv) Formación de macrocolonias (*biofilm* maduro): las microcolonias crecen de forma confluyente formando macrocolonias, las cuales colonizan de manera homogénea la superficie a la que se encuentran adheridas (Rasamiravaka *et al.*, 2015) y (v) Dispersión: proceso de lisis controlada que le permite

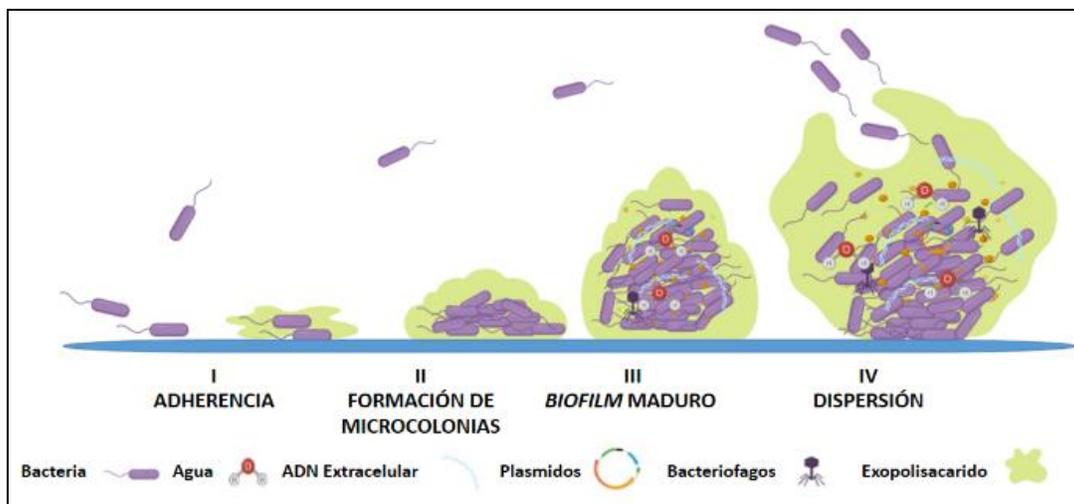
a las bacterias dispersarse para colonizar sitios diferentes del hospedero (Römling & Balsalobre, 2012). Adicionalmente, dentro de un *biofilm* se pueden encontrar diferentes microambientes en donde la concentración de nutrientes, pH y disponibilidad de oxígeno son diferentes; ello favorece la variabilidad genotípica y fenotípica de las bacterias que forman el *biofilm*, incluso si está formado por bacterias de una sola especie (Ramírez *et al.*, 2014).

Las células en estado planctónico difieren de las células en estado sésil (*biofilm*) en su morfología, fisiología y metabolismo; Lo anterior refleja los cambios en la expresión génica de las bacterias frente a las diferentes señales ambientales como temperatura, pH, oxígeno y nutrientes (Ramírez *et al.*, 2014). Estos cambios son percibidos por las células bacterianas por medio de proteínas relacionadas con diferentes mecanismos de comunicación celular como el *QS*. Sumado a ello, estos mecanismos se encuentran vinculados con las diferentes rutas metabólicas de los microorganismos formadores de *biofilm* como el caso de *P. aeruginosa*, en la que al menos el 6% (más de 300 genes) del genoma de 6,3 MB está regulado por AHL a través de los sistemas de detección de *quórum las* y *rhl* (Williams *et al.*, 2007).

Figura

2.

Proceso de formación de biofilm: El desarrollo implica cuatro etapas. I. Adherencia; II. Formación de microcolonias; III. Maduración de biofilm con formación de macrocolonias y IV. Dispersión. Se observan algunos componentes que favorecen los procesos de resistencia a múltiples fármacos: ADN extracelular, plásmidos, bacteriófagos y exopolisacáridos.



Nota. Modificado de (Rasamiravaka *et al.*, 2015)

1.4 Farmacorresistencia del *biofilm*

La formación de *biofilm* se considera una de las causas esenciales de resistencia bacteriana frente a diferentes tratamientos químicos, físicos y agentes antimicrobianos convencionales (Camele *et al.*, 2019). Las células bacterianas en estado sésil poseen mayor resistencia a los antibióticos que en estado planctónico, debido a que: (i) el EPS actúa como una barrera física y química; (ii) el ADN extracelular posee carga negativa, lo que permite la unión a los antibióticos con carga positiva, disminuyendo su concentración efectiva; (iii) el metabolismo celular se encuentra disminuido, por lo cual los antibióticos que actúan sobre células en división no tienen

efecto significativo; y (iv) la síntesis de enzimas que permiten la degradación de antibióticos aumenta (por ejemplo, enzimas lactamasas en *P. aeruginosa*); (v) se favorece el intercambio de ADN extra cromosómico (plásmidos) entre las bacterias embebidas en el EPS; (vi) la formación de células persistentes dentro de la matriz del *biofilm* favorece la resistencia antimicrobiana; y (vii) el sistema de *QS* contribuye a la tolerancia antimicrobiana y resistencia al sistema inmune del huésped (Sagar *et al.*, 2016).

1.5 *QS* y *biofilm* en *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Pseudomonadaceae y miembro de la clase γ -proteobacteria. Es un microorganismo ubicuo y patógeno oportunista, formador de *biofilm*, responsable de infecciones nosocomiales especialmente en pacientes inmunosuprimidos (Algburi *et al.*, 2017). En estado sésil, *P. aeruginosa* presenta resistencia a diferentes antimicrobianos y al sistema inmune del huésped, por lo que puede llevar al desarrollo de infecciones crónicas relacionadas con el tracto urinario, cateterismo, infecciones por intubación y fibrosis quística debido al desarrollo de *biofilm* sobre dispositivos médicos cardíacos, articulaciones protésicas, catéteres intravasculares, derivaciones e injertos vasculares protésicos (Skariyachan *et al.*, 2018). La matriz del *biofilm* de *P. aeruginosa* es una mezcla de polisacáridos (Psl, Pel y alginato), ácidos nucleicos y proteínas. Psl es codificado a partir del locus de síntesis de polisacárido (PA2231-2245) y se requiere para que las células bacterianas se adhieran al sustrato y mantengan la estructura del *biofilm*. Sumado a ello, el ADN extracelular funciona como un componente de interconexión de célula a célula en la biopelícula y favorece la resistencia a antibióticos (Ma *et al.*, 2009).

El sistema de *QS* de *P. aeruginosa* es uno de los más estudiados; funciona a través de los receptores principales tipo LuxR, que después de la unión del autoinductor en el citoplasma, funcionan como activadores transcripcionales. Actualmente, se han estudiado cuatro vías de detección de *QS* en *P. aeruginosa*: dos sistemas tipo LuxR y tipo LuxI llamados 1) LasR y LasI y 2) RhlR y RhlI, 3) el sistema de quinolona controlado por PqsR y 4) el sistema IQS que funciona en condiciones limitantes de fosfato (Papenfort *et al.*, 2017). La sintetasa LasI es responsable de la síntesis de N - (3-oxododecanoil) homoserina lactona (3-oxo-C12-AHL), que se une al receptor LasR. Esta unión promueve la transcripción de diferentes genes responsables de la virulencia y formación de *biofilm*. LasI también regula de manera positiva el sistema *rhl*, que dirige la síntesis de lactona N- butanoilhomoserina (C4-AHL,) que se une a su receptor RhlR. Sumado a ello, se encuentra la "Señal de Quinolona de *Pseudomonas*" (PQS, por sus siglas en inglés) que se entrelaza entre los sistemas *las* y *rhl* (Fong *et al.*, 2019). Dada esta información, cabe resaltar que la inhibición de una de las vías de detección de *quorum*, no garantiza la no expresión de los genes de virulencia y formación de *biofilm* en *P. aeruginosa*, a causa de las diferentes vías de comunicación celular que existen en las bacterias que no involucran el *QS*.

Diferentes estudios han demostrado el aumento de factores de virulencia asociados con moléculas relacionadas con el *QS* (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona; 3-oxo-C12 -AHL y N-butil-L-AHL) en *P. aeruginosa*, como la producción de alginato, ramnolípidos y piocianina (Ringel & Brüser, 2018), lo que favorece posteriormente el proceso de colonización y formación de *biofilm* del microorganismo; como sucede por ejemplo durante la fibrosis quística (Oberhardt *et al.*, 2008; Oberhardt *et al.*, 2010). Adicionalmente, las vías metabólicas de los carbohidratos, poliaminas (moléculas asociadas al estrés oxidativo), ácidos grasos y lípidos, pueden verse afectadas cuando existen modificaciones en la señalización mediada por *QS*; Esto se debe al alto costo energético

que conlleva la activación de los diferentes componentes relacionados con las vías del QS y la modificación directa de los lípidos de membrana existentes, entre otros (Davenport & Griffin, 2015).

1.6 QS y *biofilm* en *S. Enteritidis*

S. enterica es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Las infecciones causadas por *Salmonella* generan un grave problema de salud pública, al ser uno de los principales microorganismos transmitidos por los alimentos y generar cientos de muertes cada año (Organización Mundial de la Salud, 2017). *S. enterica* serotipo *Enteritidis* es uno de los serotipos más comunes responsable de gastroenteritis junto con *S. enterica* serovar *Typhimurium*, ocasionando un gran número de enfermedades humanas en los Estados Unidos, a pesar de la implementación continua de medidas de control y prevención (Steenackers *et al.*, 2012). La supervivencia de los diferentes serotipos de *Salmonella* en diferentes ambientes depende, entre otros factores del pH, la temperatura, el sistema inmune del hospedero y su respuesta a diferentes serotipos, la presencia de organismos comensales y el genotipo de la bacteria (Foley *et al.*, 2013), en donde el gen *spiA* ha mostrado estar involucrado tanto en la formación de *biofilm*, como en la virulencia de *S. enteritidis* (Dong *et al.*, 2011).

El QS en *Salmonella spp.* puede estar mediado por tres tipos de autoinductores (AI), llamados AI-1, AI-2 y AI-3. La comunicación AI-1 que es usada por bacterias Gram negativas, está incompleta en *Salmonella* ya que ella no contiene un gen *luxI* homólogo que codifique la sintasa AI-1; por lo anterior, la bacteria es incapaz de producir su propia señal de acil homoserina lactona (AHL). Sin embargo, presenta una proteína conocida como SdiA, un regulador de la

transcripción homólogo a LuxR, que detecta las AHL producido por otros microorganismos. El sistema AI-2 se encuentra en *Salmonella* donde la molécula señal es sintetizada por LuxS e internalizada a través de productos del operón *lsr*; Finalmente, la señal del sistema AI-3 es detectada por los productos del operón *qseBC* y del gen *qseE*. Estos procesos de comunicación favorecen el crecimiento, adhesión, formación de *biofilm* sobre diferentes superficies sumado a la expresión de diversos factores de virulencia como (Alves *et al.*, 2016).

1.7 Transcriptómica

El transcriptoma es el conjunto completo de transcripciones en una célula, en una etapa de desarrollo específica o condición fisiológica y es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma y revelar los componentes moleculares de las células (Z. Wang *et al.*, 2019). Diferentes investigaciones se han enfocado en evaluar por medio de esta herramienta, el posible efecto de los AE sobre diversos microorganismos patógenos. Ejemplo de lo anterior, es el estudio que se hizo sobre la determinación del efecto del AE de *Melaleuca alternifolia* sobre el gorgojo del cereal *Sitophilus zeamais* (Liao *et al.*, 2016) o el trabajo de Wang en 2019, en dónde se evaluó el efecto del AE de citral sobre el crecimiento y la biosíntesis de micotoxinas en *Alternaria alternata* (L. Wang *et al.*, 2019). Este tipo de trabajos son importantes, ya que permiten la identificación de genes candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos y mejoran la comprensión de los mecanismos moleculares que se dan intracelularmente, cuando un microorganismo es expuesto a un nuevo compuesto antibacteriano, como el planteado en el presente trabajo de investigación.

2. Estado del Arte

2.1 AE como agentes antimicrobianos

Como se mencionó anteriormente, las plantas producen metabolitos secundarios que actúan como agentes antimicrobianos contra infecciones bacterianas, parasitarias, fúngicas y víricas (Camele *et al.*, 2019). También se ha comprobado el efecto sinérgico de estos compuestos y algunos antibióticos, al inhibir las bombas de eflujo en las bacterias y logrando disminuir la concentración mínima bactericida (Rao *et al.*, 2018). La composición de los AE incluye compuestos terpenoides; compuestos aromáticos; y constituyentes alifáticos; todos claves en la actividad antimicrobiana de los AE (Maestro *et al.*, 1993; Swamy *et al.*, 2016).

Los AE han sido empleados en terapias antimicrobianas y son conocidos por el efecto antimicrobiano sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre otros microorganismos (Hood *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2011; Brackman *et al.*, 2011; Nikolić *et al.*, 2014; Ammar *et al.*, 2016; Teneva *et al.*, 2016; Banu *et al.*, 2017; Mahboubi *et al.*, 2017; He *et al.*, 2019; Nardoni *et al.*, 2019; Berdejo *et al.*, 2019; Rottini *et al.*, 2019; Le *et al.*, 2019; Vuko *et al.*, 2019). Los compuestos de los AE pueden actuar sobre pared celular y membrana citoplasmática, generando alteración en los ácidos grasos de membrana, pérdida del potencial de membrana, incremento en la permeabilidad celular, daño en las proteínas de membrana, alteración del ATP y ATPasas, liberación de contenido citoplasmático, inhibición de los mecanismos de comunicación celular tipo QS y modificación del metaboloma (Nazzaro *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015; Camele *et al.*,

2019). En las Tablas 1 y 2, se presenta una recopilación bibliográfica relacionada con estudios de AE antimicrobianos y sus mecanismos de acción.

Tabla 1.

Compuestos de AE con actividad antimicrobiana obtenidos a partir de plantas

Planta	Principal Compuesto Químico	Microorganismo Sobre El Cual Actúa	Referencia
<i>Satureja montana</i>	Timol, Paracimeno, Carvacrol	<i>S. aureus</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. mutans</i> ; <i>L. acidophilus</i>	Nicolik., et al., 2014
<i>Rheum palmatum</i>	Emodin	<i>P. aeruginosa</i>	Ding., et al., 2011
<i>Cinnamomum tamala</i>	Linalol, Cinnamaldehído	<i>P. aeruginosa</i>	Banu., et al., 2017
<i>Hamamelis virginiana</i>	Hamamelitanino	<i>P. aeruginosa</i>	Brackman., et al., 2011
<i>Cinnamomum zeylancium</i>	Cinnamaldehído	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Acinetobacter iwoffii</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Hood., et al., 2003; Ammar., et al., 2016
<i>Salvia lavuyulifolia</i>	Alcanfor, α -tujona, β -tujona, Canfeno, α -pineno, Terpeneol	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Campylobacter</i>	Teneva., et al., 2016
<i>Thymus vulgaris</i>	Carvacrol, Timol, p-Cimeno	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Mahboubi., et al., 2017
<i>Clausena lausium</i>	Cariofileno, β -Sesquifelandreno y α -Bergamoteno	<i>Candida</i>	He et al., 2019
<i>Cymbopogon flexuosum</i> ,	Limoneno, Timol	<i>Saprolegnia parasítica</i>	Nardoni et al., 2019

Planta	Principal Compuesto Químico	Microorganismo Sobre El Cual Actúa	Referencia
<i>Litsea cubeba</i> y <i>Citrus bergamia</i>			
<i>Thymus vulgaris</i>	Carvacrol, Citral y Limoneno	<i>Staphylococcus aureus</i>	Berdejo <i>et al.</i> , 2019
<i>Endlicheria bracteolata</i>	Guaiol	<i>Leishmania amazonensis</i>	Rottini <i>et al.</i> , 2019),
<i>Curcuma longa</i>	Citronellal, Isopulegol y Limoneno	<i>Trypanosoma brucei</i>	Le <i>et al.</i> , 2019
<i>Micromeria croatica</i>	β -cariofileno, Óxido cariofileno	de Virus del mosaico del pepino	Vuko <i>et al.</i> , 2019

Nota. Revisión bibliográfica de AE y su actividad biológica

Tabla 2.

Mecanismos de acción conocidos de AE sobre diferentes bacterias patógenas

Aceite Esencial	Mecanismo De Acción	Microorganismo Sobre El Cual Actúa	Referencia
Aceite de árbol de te	Inhibición de los mecanismos de comunicación celular	<i>E. coli</i>	Nazzaro <i>et al.</i> , 2013; Swammy., <i>et al</i> 2016, Zho., <i>et al</i> 2018
Carvacrol	Inhibición de síntesis de flagelina	<i>E. coli</i>	Nazzaro <i>et al.</i> , 2013, Swammy., <i>et al</i> 2016
Cinamaldehído	Inhibición del crecimiento y bioluminiscencia	<i>P. leiognathi</i>	Nazzaro <i>et al.</i> , 2013;
Carvacrol	Degradación de la pared celular	Bacterias Gram negativas	Nazzaro <i>et al.</i> , 2013, Swammy., <i>et al</i> 2016
Eugenol, cinamaldehído, vainillina, timol, carvacrol	Daño de la membrana citoplasmática y alteración del transporte de iones	<i>B. cereus</i> ; <i>E. aerogenes</i>	Nazzaro <i>et al.</i> , 2013, Ashakirin <i>et al.</i> , 2017, Flores-Encarnación <i>et al.</i> , 2016, Swammy., <i>et al</i> 2016

Aceite Esencial	Mecanismo De Acción	Microorganismo Sobre El Cual Actúa	Referencia
Eugenol, cinamaldehído, timol	Alteración de proteínas membrana	de <i>L. monocytogenes</i> ; de <i>L. sakei</i> ; <i>B. cereus</i> ; <i>E. coli</i>	Nazzaro <i>et al.</i> , 2013; Swammy., <i>et al</i> 2016
Carvarcrol, eugenol	Reducción de la fuerza motriz protónica	<i>E. coli</i>	Nazzaro <i>et al.</i> , 2013, Swammy., <i>et al</i> 2016
Eugenol, cinamaldehído, Carvarcrol	Disminución de la síntesis de ATP	<i>B. cereus</i> ; <i>E. aerogenes</i>	Nazzaro <i>et al.</i> , 2013; Ashakirin <i>et al.</i> , 2017, Flores-Encarnación <i>et al.</i> , 2016, Swammy., <i>et al</i> 2016
Vainillina	Alteración del pH intracelular	<i>L. plantarum</i>	Swammy., <i>et al</i> 2016; Flores-Encarnación <i>et al.</i> , 2016.
Carvarcrol	Inhibición de la producción de toxinas	<i>B. cereus</i>	Swammy., <i>et al</i> 2016

Nota. Revisión bibliográfica de AE y su actividad biológica

En relación con el mecanismo de acción de los AE sobre bacterias resistentes, se ha documentado que los compuestos, actúan de manera simultánea sobre diferentes blancos bacterianos, haciendo muy difíciles las modificaciones celulares que realiza la bacteria para evitar el efecto antibiótico (Yang *et al.*, 2015). Por ejemplo, con AE como el mandarín o la mejorana, se ha comprobado un efecto anti-QS al prevenir la formación de *biofilm* en productos de la industria alimentaria; o en el caso del *cis-cis-p*-mentenolida obtenido de la planta *Mentha suaveolens* ssp. *Insularis*, se ha demostrado una acción como inhibidor de la producción de violaceína y *biofilm* en *Chromobacterium violaceum* (Jean-Pierre *et al.*, 2018).

Resulta de gran interés el estudio del mecanismo de acción de los AE sobre la inhibición del QS, porque es posible reducir la patogenicidad, la resistencia antimicrobiana y la formación de

biofilm en infecciones sistémicas y locales causadas por patógenos como *S. Enteritidis* y *P. aeruginosa* (Jiang *et al.*, 2019). Las AHL y otros inductores contribuyen al desarrollo de estos mecanismos de virulencia y en consecuencia, las moléculas que inhiben las señales de comunicación celular mejoran el efecto de los compuestos antimicrobianos (Szabó *et al.*, 2009). Sumado a lo anterior, algunos estudios de secuenciación de ARN han permitido evidenciar el efecto de los AE sobre microorganismos resistentes como *Staphylococcus aureus*, demostrando un cambio significativo en la expresión de los genes que regulan la formación de *biofilm* y la biosíntesis de aminoácidos a causa del tratamiento con el aceite del árbol de té (Zhao *et al.*, 2018).

Los estudios de ARN, aportan información muy valiosa para la identificación de genes, que podrían servir para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos al determinar las posibles dianas terapéuticas del AE; lo cual se podría corroborar mediante la implementación de otras herramientas ómicas como la proteómica o la genómica. Aunque, la ventaja relevante del conocimiento del transcriptoma, es que permite una interpretación articulada de los diversos constituyentes moleculares que integran la red de respuesta génica ante un determinado evento inductor, que en este caso sería el tratamiento con el AE.

2.2 Genes implicados en la formación *biofilm* de *S. Enteritidis* y *P. aeruginosa*

En relación con la capacidad que poseen *S. Enteritidis* y *P. aeruginosa* de formar *biofilm*, algunos estudios han identificado diversos componentes genéticos (Høiby *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2011; Yaron & Römling, 2014; Hall & Mah, 2017;) implicados en la iniciación, crecimiento, maduración del *biofilm*, RAM y evasión de la respuesta inmune del hospedero (Steenackers *et al.*, 2012; Vital-Lopez *et al.*, 2015; Ali-Ahmad *et al.*, 2017; Iñiguez *et al.*, 2017; Pribul *et al.*, 2017;

Skariyachan *et al.*, 2018) como se describe en la Tabla 3. Por otro lado, para mitigar el impacto de la resistencia a los antimicrobianos convencionales, aún se requieren estudios sobre la identificación de otros genes relacionados con la formación de *biofilm*, la diferencia de la expresión génica entre el estado sésil y plantónico de las bacterias, las enzimas capaces de degradar la matriz de los EPS y trabajos comparativos basados en la transcriptómica que permitan determinar el efecto de nuevos fármacos sobre diferentes bacterias patógenas.

Tabla 3.

Genes involucrados durante la formación de biofilm o farmacoresistencia para Salmonella enterica serovariedad Enteritidis y Pseudomonas aeruginosa.

Gen	Bacteria	Producto Del Gen	Mecanismo De Acción	Referencia
<i>brlR</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Proteína BrlR de regulación transcripcional	Aumento de la expresión de las bombas de eflujo tipo RND (<i>Resistance Nodulation-cell Division</i>) como MexEF-oprN, MexCD-oprJ, MexAB-oprM, MexAB-OprM	Liao, J. <i>et al.</i> , 2013; Chambers, JR. <i>et al.</i> , 2013; Hall, C. <i>et al.</i> , 2017
<i>sagS</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Sistema regulador híbrido de dos componentes	Activación de <i>BrlR</i> al promover el incremento de GMP	Petrova, OE. <i>et al.</i> , 2011; Hall, C. <i>et al.</i> , 2017
<i>ndvB</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Proteína con actividad Glucosiltransferasa	Secuestro de antibióticos	Beaudoin, T. <i>et al.</i> , 2012; Hall, C. <i>et al.</i> , 2017
<i>PA1875-1877</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Bomba de eflujo específica de <i>biofilm</i>	Expulsión de antibióticos fuera de la célula	Hall, C. <i>et al.</i> , 2017

Gen	Bacteria	Producto Del Gen	Mecanismo De Acción	Referencia
<i>pelABCDEFGF</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Enzima biosintética de <i>Pel</i>	Posible unión con eDNA	Marmont, L. S., Rich, J. D., et al 2017; Hall, C. et al., 2017
<i>relA, spoT</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Reguladores de respuesta al estrés	Aumento de la expresión de las defensas antioxidantes y disminución de las pro oxidantes	Hall, C. et al., 2017
<i>mucA, algT</i>	<i>P. aeruginosa</i>		Biosíntesis de alginato	Høiby, N, et al., 2010
<i>yihO</i>	<i>S. enteritidis</i>	Proteína de membrana	O-Antígeno de ensamblaje capsular	Reyes, C. et al., 2013; Yaron, S. et al., 2014
<i>wcaJ</i>	<i>S. enteritidis</i>	Polímero capsular	Producción de ácido colánico	Yaron, S. et al., 2014
<i>spiA</i>	<i>S. enteritidis</i>	Proteína de membrana externa (secretina): SsaC	Sistema de secreción tipo III; Mecanismo de adherencia: flagelo	Dong, H. et al., 2011
<i>csgB/bcsA/bcsC/ bcsA/ adrA</i>	<i>S. enteritidis</i>	Subunidad menor de curli/ Subunidad catalítica de celulosa sintasa	Curli/biosíntesis de celulosa	Yaron, S. et al., 2014
<i>qnrA/qnrB/qnrS</i>	<i>S. enteritidis</i>	Proteína Qnr	Resistencia a quinolonas / fluoroquinolonas	Pribul et al., 2017
<i>psl</i>	<i>P. aeruginosa</i>		Síntesis de ESP	Ciofu et al. 2019

Nota. Revisión bibliográfica de genes involucrados en la farmacorresistencia de los microorganismos en estudio

2.3 Transcriptómica como herramienta para la evaluación del efecto de un AE sobre los microorganismos

Como se mencionó anteriormente, el estudio del transcriptoma permite identificar los genes activos en un punto particular en el tiempo y determinar además su nivel relativo de expresión génica (Lowe *et al.*, 2017). El trabajo realizado por Wu en 2008, refleja la importancia de los perfiles genómicos, transcriptómicos y proteómicos en la determinación de factores de virulencia de bacterias patógenas como *N. meningitidis*, *Y. pestis*, *M. tuberculosis* y *S.aureus* (Wu *et al.*, 2008). Un ejemplo de ello, es un análisis comparativo del genoma y el transcriptoma de *P. aeruginosa* ATCC 27853 realizado por Cao en 2017, que reveló características distintivas únicas del microorganismo, así como genes implicados en la adhesión celular y la maduración de *biofilms*, tales como pili tipo IV, exopolisacárido y componentes de la cadena de transporte de electrones (Cao *et al.*, 2017).

La transcriptómica es una herramienta que permite el estudio de la expresión de genes involucrados en la respuesta al tratamiento con los AE. Permite dilucidar las funciones del genoma, la transcripción de moléculas de ARN, las diferentes especies de ARN, sus funciones y expresión diferencial (Passos 2014; Lowe *et al.*, 2017). Investigaciones enfocadas en la transcriptoma de microorganismos como *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. han evidenciado, por ejemplo, la sobreexpresión de genes relacionados en respuesta al choque frío de *S. Enteritidis* al encontrarse expuesta a condiciones de estrés nutricional y desecación (Deng *et al.*, 2012). Además, describe cómo bajo ciertas condiciones de estrés generado por exposición a cloro, se genera una regulación negativa de los genes implicados en la biosíntesis de LPS, y un aumento en los genes implicados en la formación Fe-S y la biosíntesis de cisteína (S. Wang *et al.*, 2010). El perfil transcripcional de

P. aeruginosa en muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística, mostró la importancia de los genes implicados en la adquisición de hierro, así como aquellos involucrados en la biosíntesis de pioverdina y los reguladores de la absorción de citrato férrico FecIR en pulmón (Rossi *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha demostrado la activación de una amplia gama de factores de virulencia como lipasas, toxinas y proteasas representativas de una infección aguda, en exudados de heridas infectadas por *P. aeruginosa* (Gonzalez *et al.*, 2018).

El conjunto de datos obtenidos por medio de la transcriptómica, ha permitido asociar los niveles y perfiles de expresión de genes involucrados en la adherencia a superficies, patogénesis, factores de virulencia, vías metabólicas y mecanismos de comunicación celular bacteriana, con el efecto producido por diferentes agentes antimicrobianos. Por ejemplo, inhibición de la formación de *biofilm* y comunicación mediada por *QS* ocasionada por el tratamiento con lisozima o la combinación de resveratrol con vancomicina (Qin *et al.*, 2014; Grimm *et al.*, 2018).

Por lo anterior, el enfoque transcriptómico del presente estudio podría proporcionar una visión de la adaptación y el comportamiento de las bacterias al ser tratadas con un AE de plantas, con un posible efecto sobre las vías de comunicación celular y formación de *biofilm*.

3. Planteamiento del problema

La Resistencia Antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad de un microorganismo para evitar el efecto citotóxico de un fármaco antimicrobiano, que se puede generar debido a un proceso de presión selectiva por el uso no controlado de antibióticos, a la transferencia de material

genético entre bacterias por medio de elementos transponibles como plásmidos, la modificación de la diana terapéutica del fármaco o la neutralización del efecto del medicamento dentro de la célula bacteriana (Vignoli & Seija, 2000; OMS 2015; Zaman *et al.*, 2017; OMS 2018b).

De acuerdo con la información de la CDC, por lo menos 2.8 millones de personas son infectadas por bacterias resistentes a los antibióticos y alrededor de 35.000 mueren por esta causa, en U.S.A (CDC, 2019). Adicionalmente, el impacto de las infecciones por microorganismos resistentes a los antibióticos implica altos costos de tratamiento y de estancias hospitalarias, que se encuentra alrededor de \$29,000 dólares por paciente (Roberts *et al.*, 2009; Nathwani *et al.*, 2014;), lo cual refleja la gran problemática de la ausencia de compuestos antimicrobianos alternativos (Metcalf & Bowler 2013; Nathwani *et al.*, 2014; Iñiguez *et al.*, 2017; Mackenzie *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017).

A nivel Latinoamericano, en países como Brasil, Bolivia y Perú, más de la mitad de las infecciones intrahospitalarias son causadas por patógenos resistentes a los antimicrobianos, y representan pérdidas del producto interno bruto (PIB) del 0.4% -1.6% (OPS, 2015). En Colombia, según un informe realizado entre 2012 y 2017 por el Instituto Nacional de Salud (INS), de 4.117 aislamientos clínicos, 1.190 presentaron resistencia a diferentes fármacos y 1.758 se identificaron como *Pseudomonas spp*, ubicando a Antioquia, Bogotá y Santander con el mayor número de aislamientos (Ovalle *et al.*, 2017). Adicionalmente, un informe realizado por el mismo ente gubernamental entre 1997 y 2017, para *Salmonella spp.*, se evidenció 12.055 aislamientos; 3.429 correspondían a *S. Typhimurium* seguido de *S. Enteritidis* con 3.345. La clasificación por departamentos dada en la investigación, ubicó a Antioquia, Bogotá, Valle del Cauca, Bolívar y Boyacá con el mayor número de aislamientos; sumado a ello, *S. Enteritidis* mostró un aumento de su resistencia a la ampicilina ,tetraciclina y trimetropin-sulfametosaxol durante 2017 (Valencia *et*

al., 2018). Con el propósito de guiar y promover la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos que permitan disminuir la RAM, la OMS publicó la primera lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos y adicionalmente, el análisis clínico del 2019 de esta entidad, describe todos los antibióticos y tratamientos biológicos que se encuentran actualmente en desarrollo en relación con la lista de patógenos prioritarios. (Beyer & Paulin, 2020; OMS 2017). En ella se destacan bacterias Gram negativas tales como *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp., debido a su capacidad innata de generar nuevas formas de resistencia antimicrobiana y de transmitir material genético a otras especies permitiendo la propagación de la farmacoresistencia (Beyer & Paulin, 2020; CDC, 2019; OMS, 2017).

Adicionalmente, la RAM se ve favorecida cuando los microorganismos poseen la capacidad de formar *biofilm* (Hall & Mah, 2017). Sumado a los anterior, el *QS* al ser un mecanismo regulador de la transcripción que permite a las bacterias coordinar el perfil de la expresión génica, influye notoriamente en el control de la producción de factores de virulencia secretados por microorganismos formadores de *biofilm* (Davenport & Griffin, 2015). Por lo tanto, resulta de gran interés encontrar compuestos antimicrobianos que además de ocasionen la inhibición del *QS* y la formación de *biofilm*.

Frente a la necesidad de desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos alternativos a los antibióticos convencionales, se han propuesto los AE , a los cuales se les ha demostrado un importante efecto antimicrobiano sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Tabla 2 y 3) , gracias a su composición química (Yang *et al.*, 2015; Ammar *et al.*, 2016; Swamy *et al.*, 2016), los cuales muestran un amplio espectro de acción.

En consecuencia, surge el interés por estudiar el mecanismo de acción de este tipo de compuestos naturales. Hasta el momento, existe un vacío relacionado con la ausencia de estudios

transcriptómicos que evalúen el efecto de los AE sobre la inhibición del *QS* y la formación de *biofilm* por *S. Enteritidis* y *P. aeruginosa*. Estudios en este campo son necesarios para la identificación del conjunto completo de transcritos de ARN producidos por el genoma y los genes que se regulan positiva y negativamente, al tratar este tipo de bacterias patógenas con agentes antimicrobianos como los AE de plantas. Con base en ello y con la ayuda de otras ciencias como la metabolómica y la proteómica planteadas en el proyecto marco dentro del cual se encuentra adjunto este proyecto de investigación, se permitirían identificar posibles dianas terapéuticas, necesarias para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos, y así mitigar el impacto de la resistencia a los antimicrobianos convencionales.

4. Pregunta de Investigación

El presente estudio planteó dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles podrían ser los posibles mecanismos de acción de un AE sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 relacionados con el *QS* y formación de *biofilm*, que pueden ser identificados mediante el uso de la transcriptómica?

5. Hipótesis

Los AE de plantas aromáticas colombianas afectan significativamente la expresión de genes relacionados con el *QS* y de formación de *biofilm* de *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Determinar el efecto de un aceite esencial de plantas aromáticas sobre el perfil transcriptómico de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 durante la inhibición del *quorum sensing* y formación de *biofilm*.

6.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el aceite esencial con mayor efecto inhibitorio del *quorum sensing* y formación de *biofilm* en *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

- Determinar diferencias en los perfiles transcriptómicos de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en estado sésil, al ser tratados con el aceite esencial seleccionado.
- Identificar los principales transcritos y rutas metabólicas afectadas durante la inhibición del *quorum sensing* y formación de *biofilm*, en *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ocasionada por el aceite esencial seleccionado.

7. Materiales y métodos

7.1 Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas de *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 adquiridas comercialmente (Laboratorio Labcare de Colombia). Las pruebas de inhibición de *QS* se llevaron a cabo utilizando el microorganismo reportero *C. violaceum* cepa CV206 donado por la Universidad de Santander (UDES).

7.2 AE evaluados

Los 11 AE evaluados fueron *Lippia alba*, *Lippia origanoides* (LO), *Cymbopogon Nardus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinali*, *Swinglea glutinosa*, *Tagetes lucida*, *Thymus vulgaris*, *Satureja viminea* y *Cananga odorata*. Los cuales fueron suministrados y

caracterizados por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales, Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) de la Universidad Industrial de Santander

7.3 Selección de medios de cultivo para bacterias en estado planctónico y sésil

Se probaron diferentes medios de cultivo publicados en la literatura y se seleccionaron aquellos que proporcionaban las condiciones óptimas para el crecimiento de *S. Enteritidis* y *P. aeruginosa* en estado sésil y planctónico. Los medios de cultivo evaluados fueron: Luria Bertani (LB), Mueller Hinton (MH), Tripticasa de Soya (TSB), Infusión Cerebro Corazón (BHI), M63 y Roswell Park Memorial Institute RPMI (Cerqueira *et al.*, 2013; Grzywacz *et al.*, 2017; O'Toole, 2011; Stepanovic *et al.*, 2007). Las cinéticas de crecimiento microbiano se llevaron a cabo en microplacas de fondo plano Nunclon Delta Surface (Thermo Fisher Scientific; U.S.A). Inicialmente, los preinóculos de *S. Enteritidis* y *P. aeruginosa* (DO 0.13 -0.15; $1.5 \cdot 10^8$ UFC ml y volumen final de 5mL) se cultivaron en cada medio propuesto a 37°C y 230 rpm en agitación orbital (MaxQ™ 4000 de Thermo Scientific™). Posteriormente, el cultivo de cada cepa se ajustó a 0.5 en la escala de McFarland (DO 0.08 - 0.13; $1.5 \cdot 10^8$ UFC ml y volumen final de 3mL) y se tomaron alícuotas de 100 μl de estas suspensiones celulares para ser mezcladas con 100 μl del medio de cultivo a evaluar en la microplacas de fondo plano Nunclon Delta Surface (Thermo Fisher Scientific; U.S.A). Luego, las microplacas se llevaron a incubar a 37°C , manteniendo en agitación orbital de 230 rpm en un equipo MaxQ™ 4000 de Thermo Scientific™. Se tomaron mediciones de absorbancia a 595 nm por medio de un equipo iMark™ Microplate Absorbance Reader de Bio-Rad, cada 30 minutos durante un período de 10 horas.

7.4 Selección del AE con mayor efecto antimicrobiano e inhibitorio del *QS* y formación de *biofilm*

La selección del AE con mayor actividad biológica, se hizo con base en la evaluación de la actividad antimicrobiana y la capacidad para inhibir el crecimiento del *biofilm* y el *QS* de las cepas bacterianas en estudio, tal como se describe a continuación:

7.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de AE

S. Enteritidis y *P. aeruginosa* se cultivaron en los medios seleccionados para cada bacteria a 37 ° C y 230 rpm durante 12 h (MaxQ™ 4000 de Thermo Scientific™). Posteriormente, el cultivo de cada cepa se ajustó a una densidad óptica de 0.5 (longitud de onda 595 nm) en la escala de McFarland (1.5 10⁸ UFC ml) y se tomaron alícuotas de 100 µl de estas suspensiones celulares, se mezclaron con 100 µl de la solución de AE a diferentes concentraciones (1.5 mg/mL; 0.75 mg/mL; 0.37 mg/mL y 0.18 mg/mL) en una microplaca de 96 pocillos (Nunclon Delta Surface, Thermo Fisher Scientific; U.S.A). Las microplacas fueron incubadas a 37 ° C y 230 rpm (MaxQ™ 4000 de Thermo Scientific™), durante 10 h (por triplicado). Durante este tiempo se realizó la medición la absorbancia a 595 nm por medio de un equipo iMark™ Microplate Absorbance Reader de Bio-Rad. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó como la concentración más baja del AE que inhibió el crecimiento de los microorganismos, la concentración-que inhibió al 50 % de los microorganismos como (CMI₅₀) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) como aquella que inhibió el crecimiento del 100% de las bacterias en los medios de cultivo establecidos. Los controles empleados fueron los siguientes: 1) medio de cultivo sin inóculo bacteriano y sin

AE; 2) medio de cultivo con inóculo bacteriano, sin AE; 3) medio de cultivo con inóculo bacteriano y ofloxacina a una concentración final de 0.00037 mg/mL.

7.4.2 Evaluación de la inhibición de formación de biofilm por los AE con mayor actividad antimicrobiana

El protocolo se llevó a cabo utilizando la técnica colorimétrica de Cristal Violeta descrita por O'Toole, (O'Toole, 2011) con algunas modificaciones estandarizadas en el laboratorio de investigación. Se emplearon microplacas de PVC de 96 pozos con fondo en U (Costar®, USA) que sirvieron como superficie inerte para la adherencia del *biofilm*. A continuación se describen las etapas del procedimiento: (i) Se cultivaron las cepas bacterianas durante toda la noche en el medio de cultivo seleccionado (preinóculo “*overnight*”); (ii) Se diluyó el preinóculo 1:100 en medio fresco y se agregó la dilución junto con el AE a un volumen final de 160 μ L en una microplaca de PVC la cual se incubó a 37°C por 24h; (iii) Se descartaron las células bacterianas en estado planctónico y el medio de cultivo girando la placa, la cual se sumergió suavemente en una pequeña de tina solución salina y repitiendo el proceso 2 veces; (iv) Posteriormente, se adicionaron 160 μ L de una solución al 0.4% de cristal violeta en agua a cada pocillo de la placa de microtitulación y se llevó a incubación a 37°C por 15 min; (v) Se lavaron tres veces las placas con solución salina y se dejaron secar a temperatura ambiente; (vi) Se fotografiaron los pocillos para evidenciar la formación de *biofilm* y se adicionó a cada uno de ellos 160 μ L de ácido acético al 30% en agua para solubilizar el cristal violeta y se llevó a incubar a temperatura ambiente por 15 min; (vii) Se transfirieron 160 μ L del cristal violeta solubilizado a una nueva placa de microtitulación de fondo plano; y (viii) se cuantificó la absorbancia a 595 nm por medio de un

equipo iMark™ Microplate usando ácido acético al 30% en agua como blanco. Cabe mencionar que el Cristal Violeta, por ser un tinte básico, se une a moléculas con carga negativa en su superficie y a los polisacáridos en la matriz extracelular, por lo cual la absorbancia obtenida a 595nm se estima proporcional a la biomasa del *biofilm* formado (Martínez, 2010).

7.4.3 Evaluación de la inhibición del QS por el AE con mayor actividad antimicrobiana y anti-*biofilm*

La inhibición del QS se evaluó utilizando la bacteria reportera *C. violaceum* CV026. Esta bacteria Gram negativa se encuentra comúnmente en suelo y agua, y emplea un sistema de QS tipo LuxI/LuxR. Dicho sistema influye sobre varios rasgos que incluyen la producción de elastasa, la formación de *biofilm*, la actividad quitinolítica o la producción de violaceína (McClellan *et al.*, 1997; Bhagwath *et al.*, 2013; Jean-Pierre *et al.*, 2018). Esta última es empleada como un indicador de la comunicación celular mediada por QS dada por N-acilhomoserina (AHL).

El microorganismo se cultivó en medio líquido LB, en condiciones aerobias, a temperatura ambiente y una agitación de 150 rpm orbital durante 24h. Posteriormente, 100 µl con una suspensión 10^8 UFC/mL de bacterias, se expusieron a 100 µl del AE esencial en diferentes concentraciones (1.5 mg/mL; 0.75 mg/mL; 0.37 mg/mL y 0.18 mg/mL), durante 24h, agitación orbital 150 rpm (MaxQ™ 4000 de Thermo Scientific™) y temperatura ambiente, en un volumen final de 3 ml de medio LB (Husain *et al.*, 2017; Musthafa *et al.*, 2010). Se tomó como resultado positivo de la inhibición del QS, la ausencia de violaceína en el medio de crecimiento (Choo *et al.*, 2006; Suryanarayana *et al.*, 2013). Como control negativo se empleó *C. violaceum* incubado en caldo LB sin la adición de sustancias bioactivas. Finalmente, se determinó el porcentaje de

inhibición de violaceína según la siguiente formula, evaluando a una DO de 595 nm (Cárcamo *et al.*, 2014):

$$\text{Porcentaje de inhibición de violaceína} = 100 \times \frac{\text{DO control} - \text{DO test}}{\text{DO control}}$$

7.5 Formación e inhibición de *biofilm* por el AE seleccionado en biorreactores de 50 mL

Los ensayos de formación e inhibición de *biofilm* monoespecie usando el AE seleccionado se escalaron en biorreactores de 50 mL con burbujeo, que contenían cupones de vidrio esmerilado de 15 cm x 2 cm y un área total de 60 cm², usando un volumen de trabajo de 35mL (Figura 3). Para ello, se inocularon 3.5 mL de suspensión bacteriana, la cual tenía una concentración de ~10⁸ UFC/mL en los biorreactores que contenían los cupones, el medio de cultivo y el AE seleccionado, a una concentración inferior a la CMI para favorecer la formación de *biofilm* de cada una de las bacterias por separado. Seguido a ello, se incubó por un periodo establecido según pruebas de cinética de formación de *biofilm* (24h, 48h o 72 h) a 37 °C. Al cabo del tiempo de muestreo se retiraron los cupones para remover las células sésiles por medio de espátulas estériles y se procedía con la etapa de extracción de ARN a las 24h. Adicionalmente, se incluyó un control de células *biofilm* no tratadas con el aceite esencial, realizando 3 réplicas biológicas de cada ensayo.

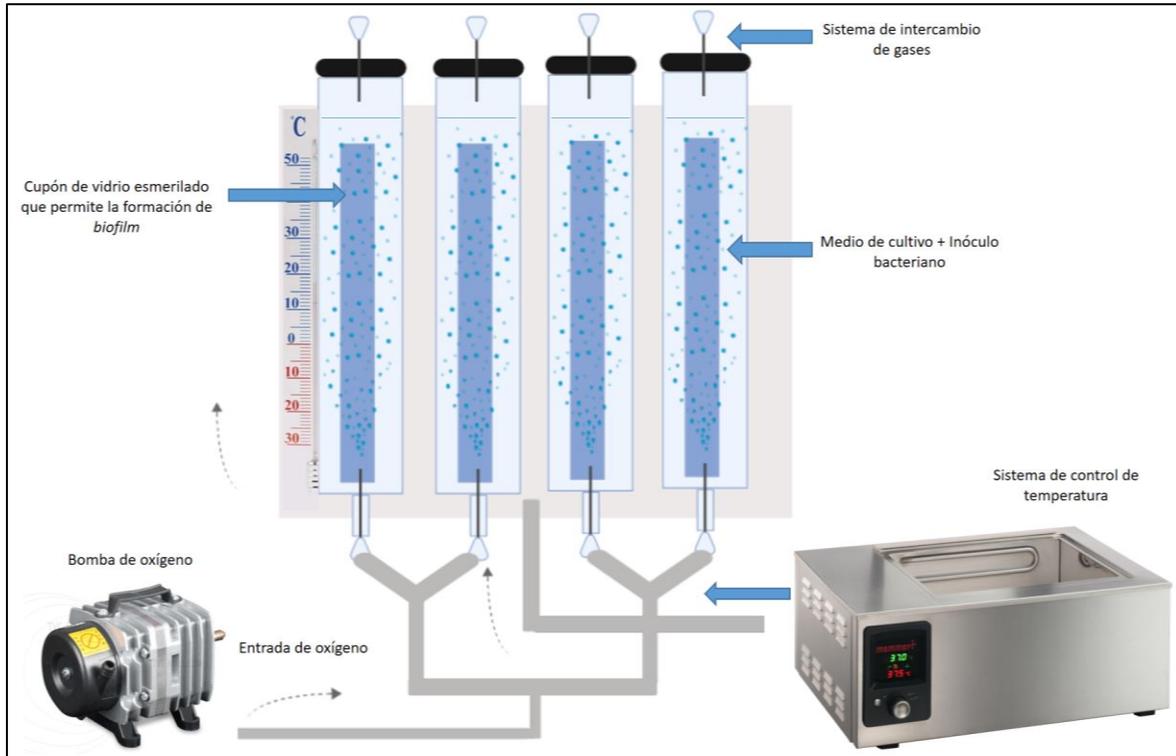
Para la evaluación de la formación de *biofilm* dentro de los biorreactores, se empleó la técnica de conteo en placa (UFC/mL), tomando mediciones a las 24, 48 y 72h. La cinética de crecimiento microbiano en estado planctónico se llevó a cabo mediante la medición de absorbancias en microplacas de fondo plano a 595nm por medio de un equipo iMark™ Microplate Absorbance Reader de Bio-Rad.

Así mismo, para analizar las modificaciones estructurales del *biofilm* después del tratamiento con el AE, se tomaron micrografías mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por su siglas en inglés), utilizando el equipo un microscopio electrónico de Barrido FEG (Field Emission Gun) QUANTA FEG 650 con alto vacío, voltaje de aceleración 20 Kv y un detector de imágenes de Electrones secundarios (SE): Everhart Thornley detector ETD (para observar morfología) y Electrones retrodispersados (BSE): Back scattered electrón detector (BSED) tipo SSD (para observar variaciones de composición).

La formación del *biofilm* de *P. aeruginosa* ATCC *aeruginosa* ATCC 27853 y *S. Enteritidis* ATCC13076 se llevó a cabo en cupones de vidrio esmerilado (11cm x 2cm), utilizando los medios de cultivo y las condiciones experimentales descritas previamente. Posteriormente, los cupones fueron lavados tres veces con buffer fosfato pH 7 con el fin de remover las células planctónicas. Finalmente, se realizó el proceso de fijación con glutaraldehído al 2.5% por 60 min y se deshidrataron las muestras con un gradiente de isopropanol (10-95%) por 10 min (Fischer 2012).

Figura 3.

Diseño del biorreactor de 50 ml para la obtención de biomasa bacteriana



Nota. Diseñado por GIBIM

7.6 Extracción de ARN y secuenciación masiva de transcritos

Se realizó la extracción de ARN total a partir de las células en estado sésil tratadas y no tratadas por medio del kit PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific; U.S.A) a las 24h de incubación, mediante la evaluación de la cinética de formación de *biofilm* y revisión bibliográfica, en dónde las células fueron lisadas y homogeneizadas en presencia de isotiocianato de guanidina. Las muestras se procesaron a través de una membrana a base de sílice, seguido a ello se dio el lavado del ARN total purificado y se eluyó en agua sin ARNasa (Tris Buffer, pH 7,5). Posterior al proceso de extracción se evaluó la purificación del ARN en un equipo IMPLEN NanoPhotometer

NP80. La secuenciación masiva de ARN se realizó en el laboratorio Macrogen Inc., utilizando muestras de ARN total a las cuales se les realizó una depleción del ARN ribosomal mediante Ribo-Zero (Illumina) previo al proceso de secuenciación.

Previo a la construcción de las librerías, las muestras de ARN pasaron por un control de calidad en la cual se evaluó la concentración, el volumen, el RIN (Numero de integridad del ARN) y el rRNA ratio (Radio de ARN ribosomal), los cuales permitieron evaluar la calidad e integridad del ARN obtenido. Para este estudio se trabajó con valores superiores de RIN (Número de integridad del ARN) > 7, rRNA ratio de 0.4, concentración superior a 20 ng/ μ L, cantidad total ARN >1.0 ug y volúmenes mayores a 50 uL.

Las librerías generadas se obtuvieron por fragmentación aleatoria de ADNc, seguido de la ligadura del adaptador 5' y 3'. Este proceso se dio mediante Tagmentación (basado en el uso de transposasas) mediante el kit Nextera (Illumina). Las librerías se secuenciaron por ambos sentidos usando la tecnología Illumina SBS (Sequencing by synthesis), mediante un equipo Illumina NovaSeq con un modo de corrido *paired-end* de 2x150 (Illumina 2015).

7.7 Análisis bioinformático

7.7.1 Control de calidad de las secuencias crudas

Se empleó FastQC v 0.11.8, una herramienta de control de calidad para datos de secuencia de alto rendimiento, para verificar la calidad de las secuencias obtenidas durante el proceso de secuenciación de cada uno de las muestras generadas y los resultados obtenidos se resumieron

mediante MultiQC v3. La remoción de los adaptadores “*Illumina Adapter Universal*” presentes a partir de los 90 pb se realizó por medio de Trim Galore v 0.6.4.

7.7.2 Análisis de perfiles transcriptómicos mediante MG-RAST

Finalizado el control de calidad inicial, las secuencias crudas fueron ensambladas *de novo* mediante el programa METASPADES v 1.2.4 (van der Walt *et al.*, 2017), y los archivos .fasta resultantes correspondientes a los contigs fueron cargados a la plataforma MG-RAST (*Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology*) versión 4.0.3 del laboratorio Nacional Argonne de la Universidad de Chicago, usando los siguientes parámetros: Remoción de secuencias de baja calidad empleando *DynamicTrim*: (*phred*: 15 -5); e-value: 5; (%ident): 90%; *Abundancia mínima*: 1; *Representative hit* ; Length: 15 y *Base de datos*: KO (KEGG Orthology).

MG-RAST usa un “*pipeline*” que inicia con un control de calidad adicional de las secuencias empleando los programa Solexa QA, DRISEE y Bowtie (Glass & Meyer, 2011). Posteriormente se realizó el llamado de genes codificantes de proteínas por medio del programa FragGeneScan (Rho *et al.*, 2010), el filtrado de secuencias de ARNr y la identificación de los transcritos de genes funcionales basado en la búsqueda de similitud de secuencias contra las bases de datos. De esta manera, se identificaron los cambios generales en los perfiles transcriptómicos entre las diferentes muestras, correspondientes a los primeros niveles de la ortología KEGG, y adicionalmente se obtuvieron estimados de los principales transcritos afectados por causa del AE.

Los resultados obtenidos por MG-RAST fueron soportados estadísticamente por medio del programa STAMP v2.1.3 (*Statistical Analysis of Metagenomic Profiles*) empleando un test de Welch con un test de corrección de Bonferroni y tomando un valor de significancia estadística (*p*)

de 0.05. (Parks & Beiko, 2013). Este software proporciona herramientas para determinar las diferencias estadísticamente significativas en los perfiles transcriptómicos por causa del AE empleado.

7.7.3 Multiensamblaje y análisis de expresión diferencial mediante bioconductor

El análisis de expresión diferencial de genes y la determinación de los valores de *fold change* (FC) se llevó a cabo mediante el contenedor Bioconda v1.32.1 (Dale et al., 2017), implementado en el lenguaje de programación R (Hornik, 2013). Para ello, después del control de calidad inicial se realizó el ensamblaje de secuencias mediante el *Oyster River Protocol* (ORP) v. 2.1.0 (Macmanes, 2018), que ensambla el transcriptoma utilizando un enfoque de ensamblador múltiple y luego combina esos ensamblajes en un ensamblaje final. Los ensambladores utilizados fueron Trinity v 2.8.5 (K: 75 y 55); RNAseq (versión 3.10) (K: 75 y 55) y Transabyss v 2.0.1 (K: 32). Para fusionar los ensamblajes producidos como parte del ORP, se empleó OrthoFuse (Unión de conjuntos) y OrthoFinder (infiere ortogrupos de genes codificadores de proteínas) que en conclusión fusionan efectivamente el ensamblaje de transcriptoma. La evaluación comparativa de la calidad de los transcritos ensamblados se realizó mediante Transrate v. 1.0.2 (evalúa la contigüidad del ensamblaje del transcriptoma, produciendo una puntuación basada en métricas de longitud y mapeo) y Busco v. 3.0.1 (evalúa el contenido del ensamblaje buscando en los ensamblajes ortólogos conservados de copia única).

Para la evaluación de la expresión génica diferencial se emplearon los paquetes DESeq2 y edgeR (Palu et al., 2019). La anotación funcional automática del transcriptoma ensamblado se realizó mediante Trinotate, que utiliza diferentes métodos para (i) anotación funcional, incluida la

búsqueda de homología con datos de secuencia conocidos (BLAST + / SwissProt), (ii) identificación del dominio de proteínas (HMMER / PFAM), (iii) péptida señal de proteína y predicción del dominio transmembrana (signalP / tmHMM), y (iv) aprovechando varias bases de datos de anotación (bases de datos eggNOG / GO / Kegg). Adicionalmente, este recurso también incluye TrinotateWeb, una interfaz gráfica basada en web manejada localmente para navegar anotaciones de transcriptoma.

7.7.4 Mapeo de rutas metabólicas

Se utilizó la herramienta KEGG mapper (Kanehisa & Sato, 2020) para mapear la abundancia de los transcritos identificados en los mapas de rutas metabólicas funcionales KEGG, y así determinar que rutas metabólicas se vieron afectadas por el aceite durante la formación de *biofilm* por *S. Enteritidis* y *P. aeruginosa*. Adicionalmente, se utilizó Trinotate y TrinotateWeb para la obtención la anotación funcional en diferentes rutas metabólicas teniendo en cuenta varias bases de datos de anotación como eggNOG, GO y KEGG.

7.8 Análisis estadístico

Las pruebas de actividad antimicrobiana, antibiofilm y aintiquorum sensing se realizaron por triplicado y fueron validadas a través de ANOVA unidireccional con un nivel de significancia del 5%. Para el análisis bioinformático por medio de MG-RAST se empleó el software para el análisis estadístico STAMP V. 2.1.3, en el cual se empleó un test de Welch (2 Grupos) con un test de corrección de Bonferroni (empleado para comparaciones multiples) tomando un valor de

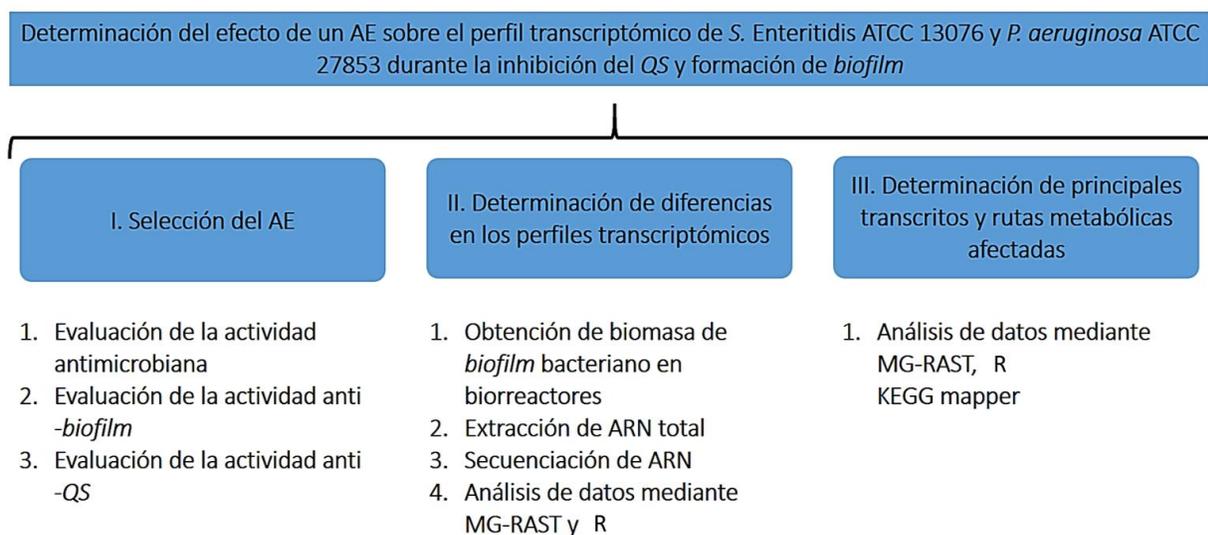
significancia estadística (p) de 0.05. Para detectar transcripciones y genes expresados diferencialmente, se ejecutaron métodos de análisis estadístico por medio de DESeq2 y edgeR integrados en el marco de análisis de Trinity en el bioconductor de R; lo que permitió obtener datos que incluyen el *log fold change* (logFC), *log counts per million* (logCPM), *P-value* y *false discovery rate* (FDR). Se extrajeron las transcripciones expresadas diferencialmente y se generaron mapas de calor con un logFC de 4 con una significancia de ≤ 0.001 en cualquiera de las comparaciones de muestras por pares (*pairwise sample comparisons*).

7.9 Resumen de la metodología

A manera de resumen, en la Figura 4 se presenta un esquema general, que resume la metodología utilizada para el estudio.

Figura 4.

Descripción general de la metodología



8. Resultados y discusión

8.1 Composición de los AE evaluados

Los AE y la información de composición de los mismos, fue suministrada por el CENIVAM y en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (ver Tabla 4).

Tabla 4.

Composición química de los componentes mayoritarios de los AE empleados

AE	Componentes Principales (%)
1. <i>Lippia alba</i>	Limoneno (29%), β -bourboneno (2.4%), germacreno D (12.2%), carvona (31.3%) y piperitenona (1.5%)
2. <i>LO Timol-Carvacrol II</i>	γ -Terpineno (5.2%), p-cimeno (1.1%), timol (32.7%), carvacrol (18.8%) y trans- β -cariofileno (6.4%)
3. <i>Cymbopogon Nardus</i>	Citronela (11.6%), 2,6-dimetil-2,6-octadieno (6.1%), β -citronelol (16.9%) y geraniol (17.8%)
4. <i>Cymbopogon flexuosus</i>	Neral (24.5%), geranial (33%), geraniol (7.9%) y geranil acetato (0.5%)
5. <i>Rosmarinus officinalis</i>	α -Pineno (12.7%), canfeno (7.7%), 1,8-cineol (17.5%), canfor (14.8%) y trans-cariofileno (7.8%)
6. <i>Salvia officinalis</i>	1,8-Cineol (5.3%), trans-tujoneno (20.4%), cis-tujona (5.8%), canfor (8.5%) y α -humuleno (9.8%)
7. <i>Swinglea glutinosa</i>	α -Pineno (2.6%), trans- β -cariofileno (36.6%), germacreno D (15.4%), germacreno B (10.8%) y trans-nerolidol (24.0%)
8. <i>Tagetes lucida</i>	Estragol (79.9%) y β -Mirceno (0.9%)
9. <i>Thymus vulgaris</i>	γ -Terpineno (9.5%), p-cimeno (20%), linalol (4.7%), trans- β -cariofileno (9.5%) y timol (23%)

AE	Componentes Principales (%)
10. <i>Satureja viminea</i>	1-Isopropenil-4-metil-1-ciclohexano (24.4%), trans- β -cariofileno (11.8%), pulegon (11.1%) y cis-pulegol (7.1%)
11. <i>Cananga odorata</i>	Linalool (11.7%), metil benzoato (3.7%), benzil acetato (10.3%), cinnamil cis-acetato (5.4%) y benzil benzoate (20.8%)

Nota. Caracterización de AE realizada por el CENIVAM

De acuerdo con la caracterización, el AE de *Tagetes Lucida* presentó una mayor proporción de monoterpenos oxigenados, seguido de *Cimbopogon flexuosus* y *Salvia officinalis*. Algunos autores han demostrado que estos componentes monoterpénicos facilitan la transferencia a través de la bicapa lipídica de las células bacterianas (Trombetta *et al.*, 2005).

Así mismo, los resultados mostraron que los componentes mayoritarios del aceite proveniente de *Lippia origanoides* (LO) corresponden a carvacrol y timol, lo que llevó a su clasificación como quimiotipo LO quimiotipo Timol-Carvacrol II. Cabe resaltar que a causa de una clasificación previa de los AE suministrados por el CENIVAM, se cuenta con un AE de LO quimiotipo Timol-Carvacrol I con una variación dentro de sus porcentajes del monoterpeno, derivado del cimeno carvacrol y el monoterpeno derivado del fenol timol, en comparación al tipo II (timol (32.7%), carvacrol (18.8%)). Ejemplo de lo anterior es el trabajo realizado por dos Santos y colaboradores en 2004, que permitió determinar que en la composición química de LO HBK, el carvacrol (33.5–42.9%) se identificó como el componente principal junto con el γ -terpineno (8.0–10.5%), timol (5.1–8.4%), metil timol (6.1–8.7%) y p-cimeno (11.9–15.8%) y presentó actividad antimicrobiana frente sobre microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Candida albicans* y *Candida tropicalis* (dos Santos *et al.*, 2004).

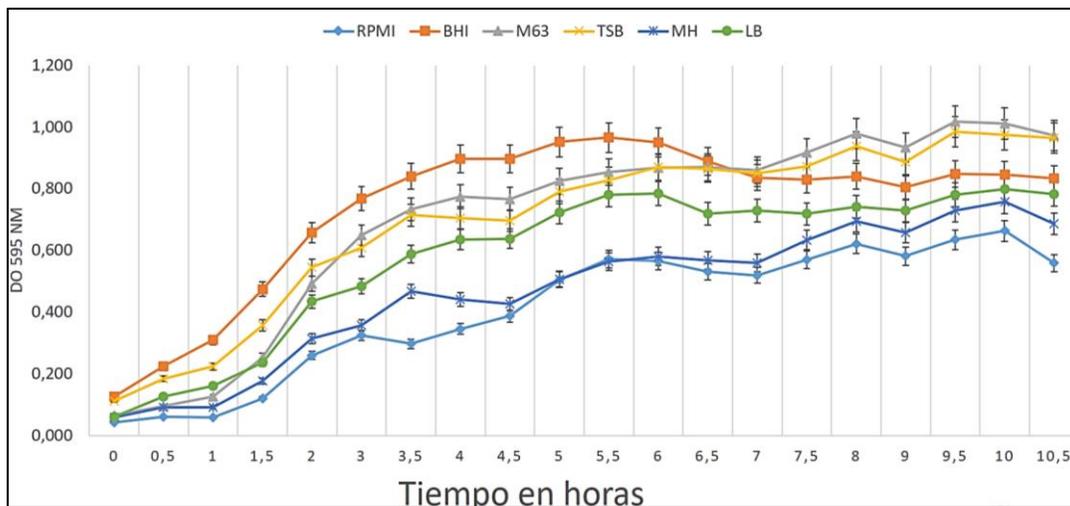
8.2 Selección de medios de cultivo

Los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento microbiano permitieron determinar que los medios de cultivo mas convenientes para el desarrollo y crecimiento de los microorganismos en estado planctónico, durante un período de 10 horas de medición, fueron LB, TSB y BHI para *P. aeruginosa* y M63, LB, y BHI para *S. Enteritidis* (Figura 5 y 6).

Figura 5.

Cinética de crecimiento en estado planctónico de P. aeruginosa, en medios RPMI, BHI, M63.

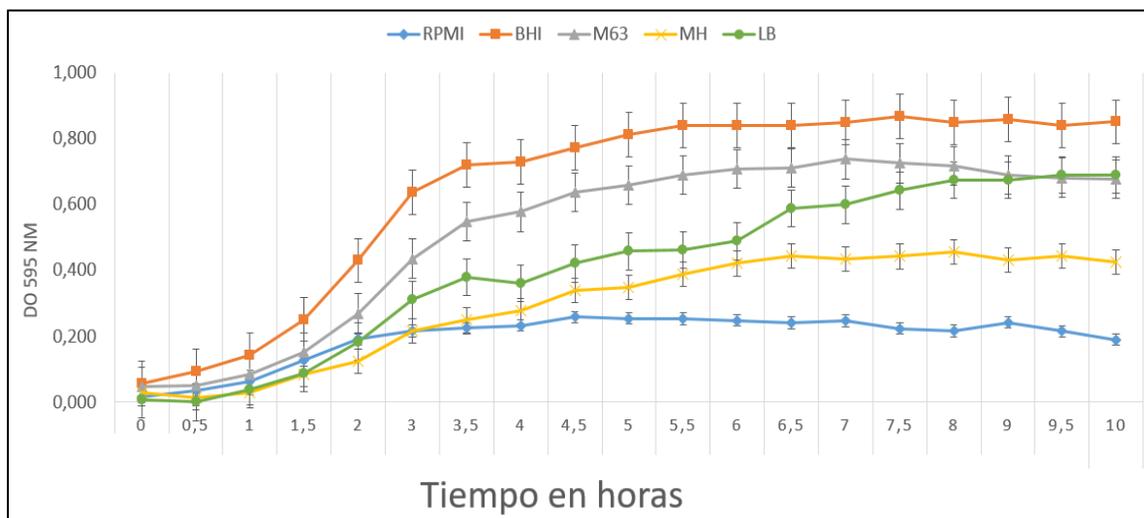
TSB, MH y LB (Agitación orbital 230rpm, 37°C)



Nota. Medición de 10.5 horas

Figura 6.

Cinética de crecimiento de *S. Enteritidis* en medios RPMI, BHI, M63, MH y LB (Agitación orbital 230rpm, 37°C).



Nota. Medición de 10 horas

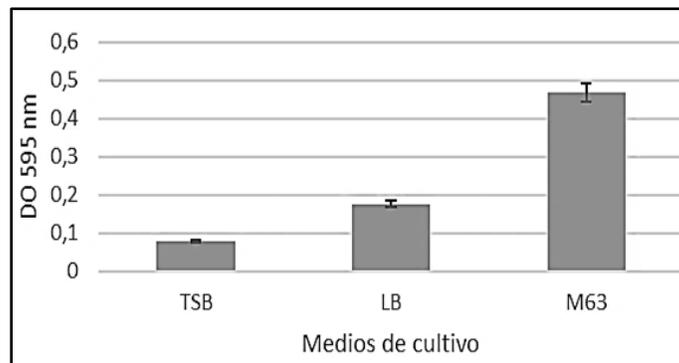
Las cinéticas de crecimiento en estado planctónico para *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis*, concuerdan con los resultados de otros autores, utilizando este tipo de medios de cultivo (Azriel et al 2015; Leclerc *et al.*, 2013; Cerqueira *et al.*, 2013; Grzywacz *et al.*, 2017; O'Toole, 2011; Stepanovic *et al.*, 2007). De acuerdo con los resultados obtenidos, los medios de cultivo TSB, LB, M63 y BHI permitieron alcanzar el crecimiento máximo de microorganismos.

De acuerdo con los medios de cultivo previamente seleccionados, se realizó una evaluación de la formación de *biofilm* y el crecimiento bacteriano se evaluó mediante el método de cristal violeta descrito en la metodología. El medio de cultivo se seleccionó de acuerdo con la mayor formación de biomasa en estado de *biofilm* de cada cepa bacteriana, con el objetivo de obtener una concentración suficiente de ARN bacteriano para los futuros estudios de transcriptómica. De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron los medios LB para *P. aeruginosa* y M63

para *S. Enteritidis*, alcanzando medidas de densidad de 0.978 (recuento en placa UFC/mL: Incontable) y 0.468 (recuento en placa UFC/mL: 7×10^7), respectivamente. Los valores máximos de densidad óptica, en el tiempo de máximo crecimiento sésil, se presentan en las Figura 7 y 8.

Figura 7.

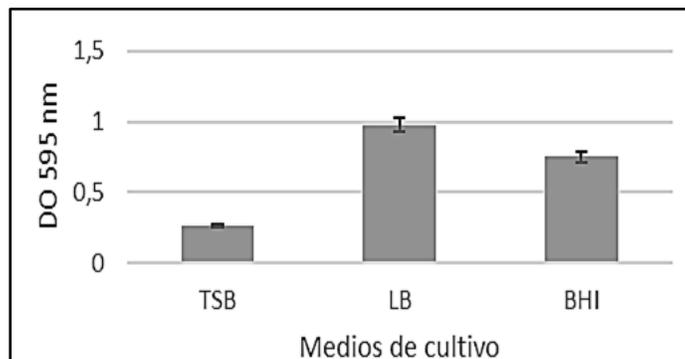
Evaluación de la formación de biofilm de P. aeruginosa en microplacas de PVC usando diferentes medios de cultivo (Técnica de cristal violeta, 37°C, 24h)



Nota. Medición de 24 horas

Figura 8.

Evaluación de la formación de biofilm de S. Enteritidis en microplacas de PVC usando diferentes medios de cultivo (Técnica de cristal violeta, 37°C, 24h)



Nota. Medición de 24 horas

Los medios de cultivo TSB, LB, M63 y BHI permitieron el mayor crecimiento en estado sésil y plantónico de los microorganismos evaluados, lo cual se debe probablemente a la composición nutricional de cada uno. En el caso del BHI los nutrientes son obtenidos de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa; Las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza. Así mismo, la glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante fermentación (Becton Dickinson, 2013). Igualmente, el medio de cultivo LB es rico en nutrientes y contiene péptidos, aminoácidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos que favorecen el crecimiento de diferentes especies microbianas, también contiene electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico de las células bacterianas. Adicionalmente, cabe resaltar como el medio de cultivo LB, es utilizado como medio de cultivo bacteriano para una variedad de organismos facultativos, de los cuales hacen parte los evaluados en este estudio (Macwilliams & Liao, 2006). Los mejores resultados obtenidos para el crecimiento de *biofilm* de *S. Enteritidis* en el medio LB, se deben probablemente a que la peptona proporciona nutrientes básicos y factores de crecimiento a las bacterias, el extracto de levadura proporciona vitaminas, aminoácidos y oligoelementos, e igualmente el cloruro de sodio mantiene el ambiente isotónico apropiado del caldo (LaBauve & Wargo, Matthew, 2015).

Así mismo, en el medio de cultivo M63, las bacterias pueden crecer fácilmente, porque contiene compuestos de carbono como la glucosa. Las sales están presentes para abastecer nitrógeno, fósforo y metales traza. Adicionalmente, el sulfato de magnesio suministra los iones de magnesio que son esenciales para la reacción enzimática de la replicación del ADN (Amresco, 1998).

El medio de cultivo M63, contiene sales que suministran el nitrógeno, fósforo y metales traza que las bacterias como *Salmonella* necesitarían para crecer (Cánovas *et al.*, 2001; Amresco,

1998). Igualmente, el medio de cultivo TSB, contiene digeridos de harina de soja y caseína, que proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, lo que lo convierte en un medio altamente nutritivo para una variedad de organismos, incluida la mayoría de las bacterias patógenas como *Pseudomonas* spp. y *Salmoenlla* spp. Adicionalmente, se agrega cloruro de sodio para mantener el equilibrio osmótico, la dextrosa se incorpora como fuente de energía y el fosfato dipotásico se incluye en la formulación como un tampón para mantener el pH (Becton Dickinson, 2019).

8.3 Selección del AE con mayor actividad antimicrobiana

En la Tabla 5, se presentan los resultados de actividad antimicrobiana de los 11 AE evaluados a diferentes concentraciones. Se destaca que los AE que mostraron una mayor actividad antimicrobiana, con una CMI de 0.75 mg/ml, fueron *LO* Timol-Carvacrol II y *Thymus vulgaris*, tanto para *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis*.

Se seleccionaron *LO* quimiotipo Timol-Carvacrol II y *T vulgaris* como los AE con mayor actividad antimicrobiana frente a *S. Enteritidis* y *P. aeruginosa*. Estos resultados, estuvieron acorde con resultados publicados por otros autores en la literatura, en donde se evidencia el efecto antimicrobiano de compuestos naturales con altas concentraciones de timol y carvacrol (Berdejo *et al.*, 2019; Mahboubi *et al.*, 2017; Oliveira, *et al.*, 2015; Al-Ani *et al.*, 2015; Nikolić *et al.*, 2014; Knowles & Roller, 2005; Olasupo *et al.*, 2003; Sarrazin *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la presencia de monoterpenos en donde el timol y carvacrol se encuentran en concentraciones mayoritarias en los AE, produce efectos antioxidantes, antimicrobianos, antitusivos, expectorantes, antiespasmódicos (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012).

Tabla 5.

Actividad antimicrobiana de los 11 AE evaluados a diferentes concentraciones en microplacas de fondo plano y agitación orbital a 230rpm, 37°C.

AE	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. enteritidis</i>	
	CMI ₅₀ (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI ₅₀ (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>Lippia alba</i>	1.5	>3	1.5	>3
<i>LO timol-carvacrol II</i>	0.75	>3	0.75	1.5
<i>Cymbopogon nardus</i>	>1.5	>3	>1.5	>3
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	>1.5	>3	>1.5	>3
<i>Rosmarinus officinalis</i>	>1.5	>3	>1.5	>3
<i>Salvia officinalis</i>	>1.5	>3	>1.5	>3
<i>Swinglea glutinosa</i>	>1.5	>3	>1.5	>3
<i>Tagetes lucida</i>	>1.5	>3	>1.5	>3
<i>Thymus vulgaris</i>	0.75	>3	0.75	1.5
<i>Satureja viminea</i>	>1.5	>3	>1.5	>3
<i>Cananga odorata</i>	>1.5	>3	>1.5	>3
Control (Ofloxacina)	0.0015	0.0037	0.00015	0.0037

Nota. CMI y CMB realizadas por microdilución en caldo

Es de destacar la CMI obtenida en este estudio de 0.75mg/mL sobre *P. aeruginosa*, la cual resultó mucho más baja que la alcanzada por otros autores, en los que se obtuvo una CMI de 5mg/mL sobre la misma especie bacteriana empleado co-fármacos de carvacrol (Cacciatore *et al.*, 2015). Se ha documentado en otros estudios, que una misma planta y un mismo quimiotipo puede

presentar variaciones en su composición, dependiendo de las condiciones de cultivo, la zona geográfica, la edad y la genética de la planta, entre otros. Los diferentes quimiotipos de *Lippia alba* han sido documentados también en Colombia y Uruguay (Ana et al., 2009; Lorenzo et al., 2001). Por lo tanto, es común encontrar diferentes resultados de actividad biológica, frente a quimiotipos iguales de AE. Así mismo, los resultados del presente trabajo son comparables con los resultados publicados por Mostafa en 2018 (Mostafa et al., 2018), un estudio en el que se evaluó la actividad antimicrobiana de diferentes AE como *Thymus vulgaris* sobre cepas bacterianas de *P. aeruginosa*; *S. typhi*; *E. coli*; *S. aureus* y *B. cereus* y se evidenció CMI efectiva 10 mg /mL. El efecto de los AE empleados en esta investigación podrían variar acorde al tipo de microorganismo sobre el cual se realicen las pruebas antimicrobianas, la composición química de cada uno de ellos (quimiotipo) (Betancourt et al., 2012) y la influencia de la variación estacional de cada región sobre la composición química del aceite (Sarrazin, Da Silva, De Assunção, et al., 2015).

Los resultados obtenidos también permitieron determinar, que entre de los 11 AE esenciales evaluados; *LO* Timol-Carvacrol II y *Thymus vulgaris* presentaron la mayor proporción de timol (32.7% y 23% respectivamente). Se ha documentado, como este compuesto vegetal proveniente de plantas como el timo y el orégano, presenta una alta actividad antimicrobiana sobre microorganismos transmitidos por los alimentos como *S. Enteritidis*, especialmente cuando se combina con compuestos como el linalol, encontrado un 4.7% en el AE de *Thymus vulgaris* evaluado en este estudio (Porter & Monu, 2019).

Igualmente, el AE con el compuesto en mayor proporción fue *Tagetes lucida* con el estragol en un 79.9%, lo cual concuerda con estudios como el de Omer en 2017, en el cual se caracterizó el AE obtenido de semillas de *T. Lúcida* importadas a Egipto desde Canadá para evaluar el impacto del suelo en la composición del AE y dónde se evidenció que dentro de los compuestos

mayoritarios se encontraba en estragol con un 95-97%. Adicionalmente, el predominio de estragol en el AE confirma que la ruta de la biosíntesis de ácido del ácido siquímico predomina en esta planta (Omer et al., 2017).

Así mismo, el segundo AE con el compuesto en mayor proporción fue *Swinglea glutinosa* (Limón africano) con el trans- β -cariofileno en un 36.6%, un sesquiterpeno bicíclico natural que es un componente de diferentes AE. *Swinglea glutinosa* ha evidenciado una alta actividad contra *Aedes aegypti*, como lo reportan los resultados obtenidos por Ríos en 2017, (Ríos et al., 2017) en dónde se evaluó la acción insecticida de diferentes AE como el mencionado previamente.

Finalmente, el trabajo realizado en Brasil por Linde en 2016 (Linde *et al.*, 2016) sobre los quimotipos, extracción, composición y aplicaciones del AE de *Lippia alba*, una planta ampliamente distribuida en zonas tropicales, subtropicales y templadas de América, África y Asia, confirman que la composición química de este AE es muy variable y que los quimiotipos fundamentales con actividad farmacológica son el citral - micreno, citral - limoneno y carvona - limoneno. Tomando en cuenta estos datos, el AE evaluado en esta tesis empleó un AE perteneciente al último quimiotipo mencionado, con compuestos como carvona en un 31.3% y limoneno en un 29%.

Es importante resaltar, que la actividad antimicrobiana de *LO* quimiotipo Timol-Carvacrol II y *T vulgaris*, se debe probablemente a la naturaleza hidrofóbica del carvacrol y timol frente a las membranas bacterianas y a la presencia de grupos hidroxilo libres en los componentes fenólicos de estos compuestos, que alteran los gradientes de iones de las células de los microorganismos (Sim *et al.*, 2019; Betancourt *et al.*, 2012).

Adicionalmente, *Lippia alba* presentó una CMI de 1.5 mg/ mL sobre las dos cepas evaluadas, en tanto que otros AE como *Cymbopogon Nardus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Rosmarinus*

officinalis, *Salvia officinalis*, *Swinglea glutinosa*, *Tagetes lucida*, *Satureja viminea* y *Cananga odorata* no presentaron una actividad antimicrobiana a las concentraciones evaluadas.

El presente trabajo, permitió determinar la actividad antimicrobiana de un AE con alta proporción de timol y carvacrol, lo cual representa una alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos debido a su alta actividad biológica contra bacterias patógenas como *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis*.

En relación con el control positivo utilizado, la ofloxacina mostró una alta eficiencia en la inhibición de *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis* tanto en estado planctónico como de *biofilm* a una CMI de 0.015mg/mL, lo cual concuerda con otros reportes (Algburi *et al.*, 2017; Kavanaugh & Ribbeck, 2012), en donde se discute cómo este antibiótico presenta una mayor actividad antimicrobiana en comparación con otros fármacos, como las Colistina o Gentamicina sobre especies bacterianas como *P.aeruginosa* ó *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, este control positivo demuestra su efecto antimicrobiano sobre bacterias no resistentes como *S. Enteritidis* ATCC 13076 o *P. aeruginosa* ATCC 27853 y permite confirmar la actividad biológica de los AE empleados.

8.4 Evaluación de la inhibición de la formación de *biofilm* de *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis* frente a *LO* Timol-Carvacrol II y *Thymus vulgaris*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la sección anterior, se realizó la evaluación de la actividad anti *biofilm* de los AE de *LO* Timol-Carvacrol II y *Thymus vulgaris*, debido a que habían exhibido mayor actividad antimicrobiana. En relación con el efecto del AE de *LO* Timol-Carvacrol II, se obtuvo un máximo de actividad, con un porcentaje de inhibición del 38% para *P.*

aeruginosa y 68% para *S. Enteritidis*, en comparación con los controles respectivos. Es decir, el *biofilm* sin tratamiento de AE, tal como se presenta en la Tabla 6. Estudios de otros autores, han demostrado que los AE con alto porcentaje de carvacrol, han producido una alta actividad antimicrobiana, debido a que este compuesto interfiere con las funciones de la membrana, aumentando la permeabilidad lipídica; inhibiendo el *QS*, favoreciendo la producción de trifosfato de adenosina celular y finalmente causando la muerte bacteriana (Burt *et al.*, 2014; Mahboubi *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que los AE evaluados presentaron una mayor actividad antibiofilm sobre *S. Enteritidis* que sobre *P. aeruginosa*. Lo anterior podría deberse a las diferencias en los genes que regulan los procesos de resistencia y formación de *biofilm* en cada especie bacteriana, tales como *mucA*, *algT*, *brlR* o *ndvB* en *P. aeruginosa* y *spiA*, *qnrA/qnrB/qnrS* en *S. Enteritidis*. Ejemplo de lo anterior, son los datos presentados por Knowles en 2005, en los cuales se reflejaba una diferencia en la respuesta al tratamiento con carvacrol sobre el *biofilm* de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium; además, se sugirió que los polisacáridos capsulares de *S. aureus*, especialmente el tipo 5 y el tipo 8, bloqueaban la difusión antimicrobiana y protegen los sitios diana citoplasmáticos sensibles al antimicrobiano (Knowles & Roller, 2005).

Tabla 6.

Actividad antibiofilm de los AE con mayor actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* cultivada en medio LB y *S. Enteritidis* en medio M63, a 37°C durante 24h

AE	Concentración evaluada	<i>P. aeruginosa</i> (DO 595 nm)	Porcentaje de inhibición	<i>S. enteritidis</i> (do 595 nm)	Porcentaje de inhibición
LO quimiotipo Timol-Carvacrol II	0.37 mg/mL	0.603 +/- 0.0	38%	0.243 +/- 0.0	68%
<i>Thymus vulgaris</i>	0.37 mg/mL	0.604 +/- 0.0	38%	0.432 +/- 0.1	43%
Control	Crecimiento en biofilm sin AE	0.98 = 100%		0.762 = 100%	

Nota. Actividad antibiofilm de los AE seleccionados con mayor actividad antimicrobiana

Los resultados obtenidos, concuerdan con los datos presentados por Marchese en 2018 (Marchese *et al.*, 2018), en dónde se demuestra que componentes como el carvacrol inhiben la formación de *biofilms* de patógenos bacterianos como *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis* a CMI similares. De igual forma, se demostró en el trabajo presentado por Miladi en 2017 (Miladi *et al.*, 2017) la actividad antibiofilm del timol y carvacrol frente a *Salmonella*.

8.5 Evaluación de la inhibición del AE de LO Timol-Carvacrol II sobre el QS de *C. violaceum* CV 026

Con base en los resultados de la actividad antimicrobiana y anti *biofilm*, se seleccionó el AE de LO Timol-Carvacrol II para continuar con las pruebas de inhibición del QS sobre el microorganismo reportero *C. violaceum* CV 026. Los resultados de inhibición del QS, presentados

en la Tabla 7, mostraron un porcentaje de inhibición del 88.86% a una concentración del AE de 0.3 mg/mL; El porcentaje de inhibición, se calculó como sigue a continuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición de violaceína} = 100 \times (1.1816 - 0.1316) / 1.1816$$

$$\text{Porcentaje de inhibición de violaceína} = 88.86 \%$$

Adicionalmente, se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana utilizando la técnica de microdilución en placa y recuento de colonias en UFC/mL, que permitieron confirmar que el AE *LO* Timol-Carvacrol II no tenía un efecto bactericida sobre *C. violaceum*, por lo cual se puede afirmar que la inhibición de la producción de violaceína relacionada con la comunicación mediada por *QS* se produjo por causa del efecto de *LO* Timol-Carvacrol II sobre la expresión del gen CViI relacionado con el operón ABCDE de la cepa reportera CV026 (Figura 9).

Tabla 7.

Evaluación del efecto del AE de LO Timol-Carvacrol II sobre el crecimiento de C. violaceum

CV026

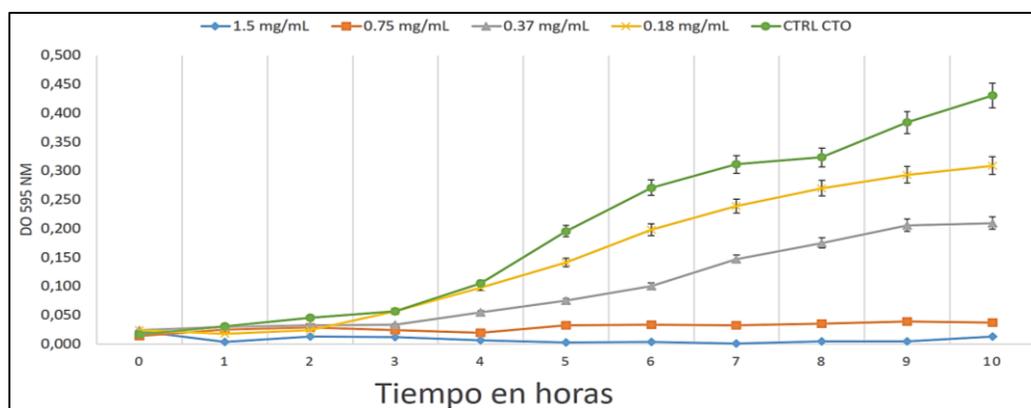
Concentración (mg/mL)	Recuento Microbiano Hora 0	Recuento Microbiano Hora 16
1.5	0 UFC/mL	33 X 10 ⁸ UFC/mL
0.75	0 UFC/mL	INC
0.37	0 UFC/mL	INC
0.18	0 UFC/mL	INC

Nota. *INC: Incontable

Como se enunció en apartados anteriores, *C. violaceum* es un bioindicador empleado para encontrar sustancias que pueden bloquear el mecanismo de comunicación celular tipo *QS*. La violaceína es un pigmento púrpura que la bacteria produce bajo el control del sistema homólogo de LuxR-LuxI; el CVIR -CviI y la molécula N -Hexanoyl-1-homoserin lactona (Figura 9) (Poli *et al.*, 2018). Debido a que es fácilmente observable y cuantificable, la producción de este pigmento se utiliza como una herramienta para medir el impacto de varias sustancias sobre el *QS*. En este caso el AE de *LO* Timol-Carvacrol II inactivó la vía de señalización tipo *QS*, probablemente por la alta concentración de componentes monoterpénicos como el carvacrol y el timol, que mediante unión con la sintasa de AHL CviI -LuxI y / o proteínas receptoras de AHL de tipo CviR-LuxR, generaron por consiguiente una disminución en la producción de violaceina y síntesis del autoinductor, tal como lo han descrito otros autores (Deryabin *et al.*, 2019; Burt *et al.*, 2014) y como se ejemplifica en la figura 10.

Figura 9.

Actividad antimicrobiana de *LO* Timol-Carvacrol II sobre *C. violaceum* CV 026, cultivada en medio líquido *LB*, en condiciones aerobias, a temperatura ambiente y agitación orbital de 150 rpm durante 24h.

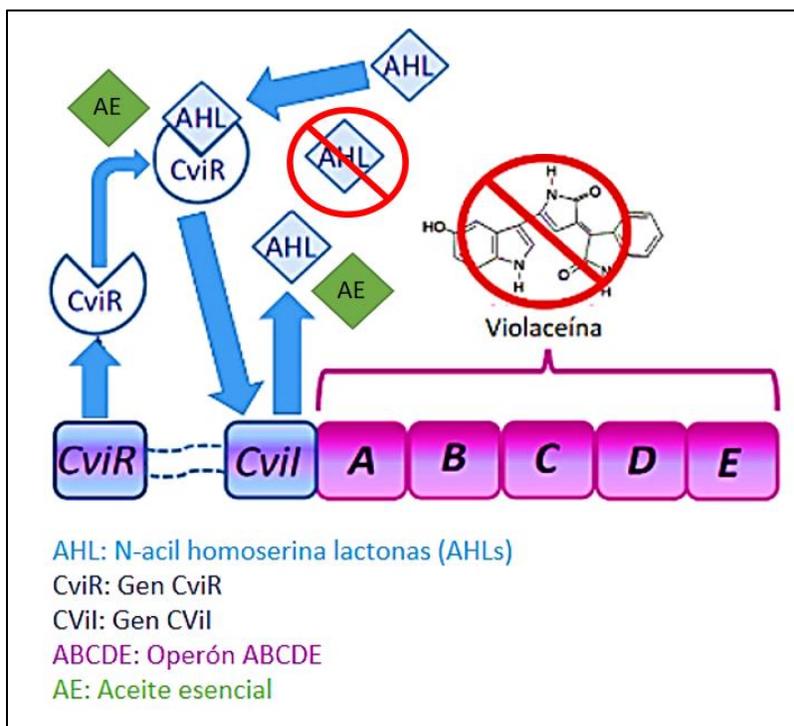


Nota. Medición de 10 horas

Figura 10.

Proceso de inhibición de la producción de violaceína por el AE sobre *C. violaceum* CV 026.

Modificado de Duran et al., 2016.



Nota. Modificado de Duran et al., 2016.

LO Timol-Carvacrol II generó la inhibición del *QS* en *C. violaceum* CV026 a una concentración que indujo una baja disminución del crecimiento celular. Teniendo en cuenta los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana, antibiofilm y anti *QS*, se seleccionó al AE de *LO* Timol-Carvacrol II como el mejor candidato entre los AE evaluados y podría ser una buena alternativa para el desarrollo de nuevas moléculas anti *QS* con aplicaciones potenciales para el control de enfermedades bacterianas mediadas por la detección de *QS*.

8.6 Formación e inhibición de *biofilm* de *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis* frente a *LO* Timol-Carvacrol II en biorreactores de 50 ml

El escalado en biorreactores de laboratorio se planteó con el fin de obtener una mayor cantidad de biomasa tanto en estado sésil como planctónico, para el proceso de extracción de ARN necesario para el estudio transcriptómico. Inicialmente se realizó una evaluación de la cinética de crecimiento microbiano en el biorreactor y adicionalmente se llevaron a cabo las pruebas antimicrobianas utilizando el AE esencial de *LO* Timol-Carvacrol II. De esta manera se buscaba confirmar que el nuevo ambiente no generara alteraciones en el proceso de formación e inhibición de *biofilm* ya estandarizado en las microplacas. Tanto *P. aeruginosa* como *S. Enteritidis* mostraron una disminución en el crecimiento y formación de *biofilm* cuando fueron tratados con *LO* Timol-Carvacrol II a una CMI de 0.75 mg/mL, tal como se evidenció en las pruebas antimicrobianas y anti *biofilm* en microplacas de fondo plano y PVC (Figura 11).

Adicionalmente, se corroboró la formación de *biofilm* bacteriano en los cupones de vidrio esmerilado mediante la coloración de cristal violeta. Sumado a lo anterior, el análisis en SEM mostró que en ausencia de AE las células bacterianas formaron *biofilms* notorios en las superficies de los cupones y en presencia de *LO* Timol-Carvacrol II se redujo la formación de agregados bacterianos en estado sésil. Como se presenta en la Figura 12, las células no tratadas de *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis* mostraron una membrana celular sin alteraciones, pero cuando se trataron con el AE seleccionado se observaron cambios estructurales en la superficie celular (Figuras b y d).

De igual manera, en las figuras a y c, se pueden observar las estructuras del *biofilm* causadas por la agregación de los microorganismos, como son las “cavernas” generadas por la

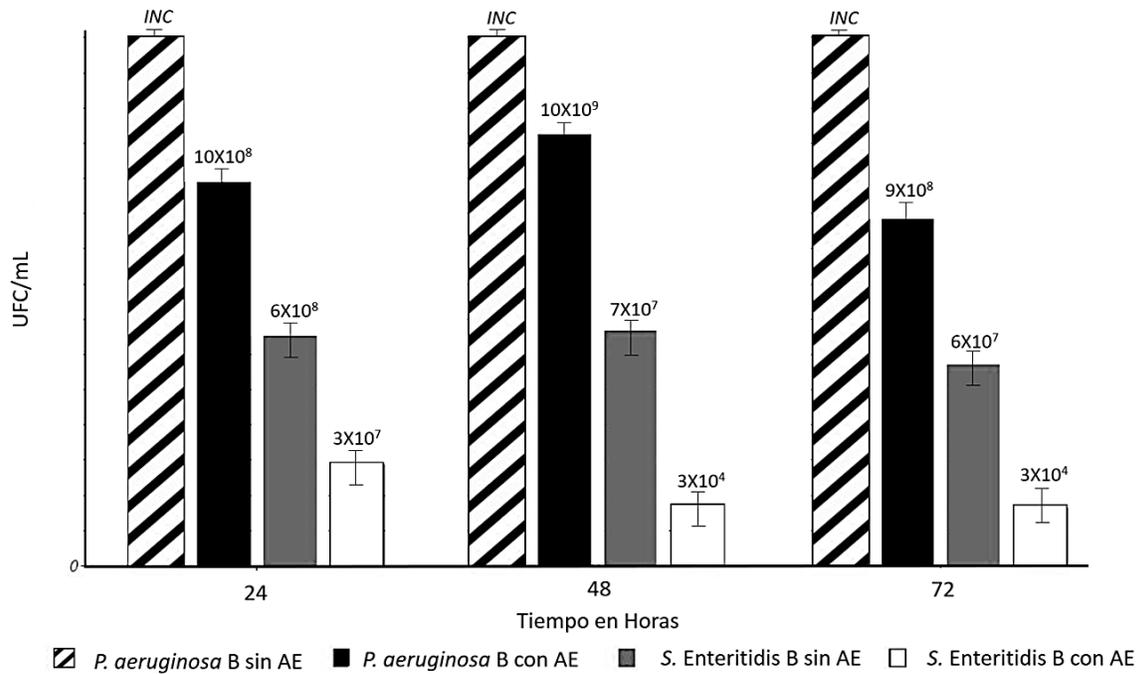
producción de EPS, que reflejan el variado suministro de nutrientes y oxígeno en el microambiente bacteriano. En contraste, cuando se realizó el tratamiento con el AE de *LO* Timol-Carvacrol II (Figuras b y d), se disminuyó notoriamente la formación de este tipo de estructuras y se observó de manera notoria, la superficie abiótica de vidrio esmerilado sobre la cual se desarrolló el *biofilm*, debido a la disminución del número de células bacterianas.

Estudios previos, han evidenciado que compuestos naturales como el carvacrol y el timol pueden generar degradación de las membranas externas de las bacterias y aumentar la permeabilidad de las mismas, generando así una apariencia corrugada en la superficie bacteriana (Miladi et al., 2017; Olasupo *et al.*, 2003). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio, podrían evidenciar un posible colapso de la membrana citoplasmática que podría conducir a la dispersión de los contenidos intracelulares después del tratamiento con el AE, tal como se ha encontrado en otros estudios, en donde el tratamiento con terpenos y terpenoides provenientes de AE o los Péptidos antimicrobianos (AMP), generan importantes alteraciones en la distribución del *biofilm* y un daño a la membrana de la superficie de las células bacterianas (Dou *et al.*, 2017; Aline *et al.*, 2019).

Figura 11.

Evaluación de la formación e inhibición de biofilm de P. aeruginosa y S. Enteritidis en

biorreactores de 50 mL, con burbujeo a 37°C. B: células en estado de biofilm; INC: Incontable.

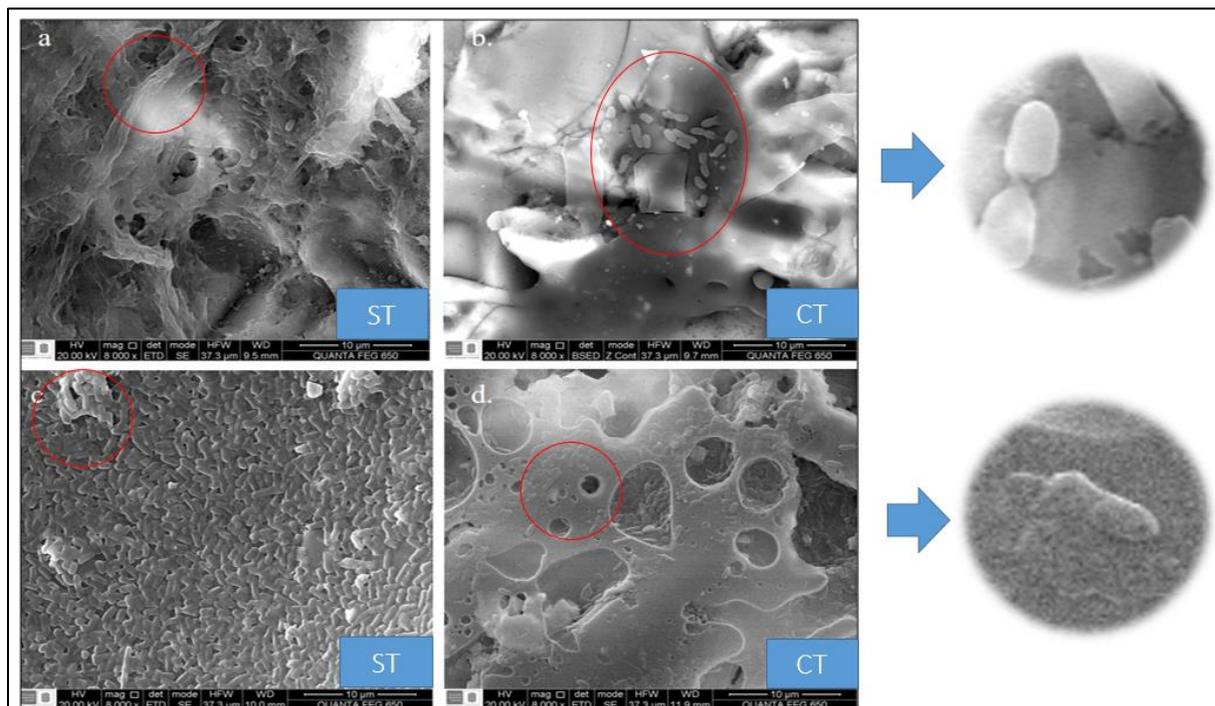


Nota. Medición de 24, 48 y 72 horas

Figura 12.

Actividad antibiofilm de LO Timol-Carvacrol II evaluada por medio de SEM. (Aumento 8.000X).

(A). *S. Enteritidis* sin tratamiento; (B). *S. Enteritidis* con tratamiento; (C.) *P. aeruginosa* sin tratamiento y (D.) *P. aeruginosa* con tratamiento.



Nota. Medición de 24 horas

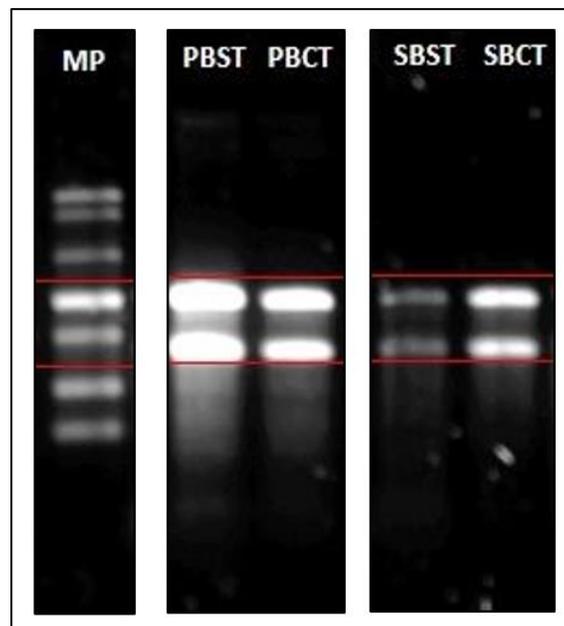
8.7 Extracción de ARN y secuenciación masiva de transcritos

En la Figura 13 se puede observar el corrido electroforético de algunas de las muestras de ARN total obtenidas a partir de los *biofilms* bacterianos de *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis*; Se resaltan las dos bandas de mayor intensidad ubicadas entre las 2000 y 3000 bases pertenecientes al ARN ribosomal (sub unidad mayor y menor) las cuales son indicadores de la calidad del ARN. Las concentraciones obtenidas en cada una de las muestras (Tabla 8) permitieron confirmar los

resultados de la calidad de la extracción de ARN. Así mismo, los resultados se encontraron dentro de los parámetros del control de calidad requeridos por el laboratorio para la generación de librerías y el proceso de secuenciación masiva: concentración >20 ng/ml; volumen: >50 uL; cantidad ARN total >1.0 ug y RIN > 7 (Tabla 9).

Figura 13.

Corrido electroforético de muestras de ARN



Nota. **MP:** Marcador de peso. **PBST:** *P. aeruginosa biofilm* sin tratamiento. **PBCT:** *P. aeruginosa biofilm* con tratamiento. **SBST:** *S. Enteritidis biofilm* sin tratamiento. **SBCT:** *S. Enteritidis biofilm* con tratamiento

Tabla 8.

Promedio de las concentraciones de ARN obtenidas por medio del proceso de extracción

Condición de la muestra	Volume n	Concentración ARN total ng/μl	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230	Número de integridad de ARN (RIN)	Cantidad total ARN obtenido μg
<i>P. aeruginosa</i> biofilm sin tratamiento (PBST)	50 uL	727.08	2.174	2.062	7.6-7.7	18.22
<i>P. aeruginosa</i> biofilm con tratamiento (PBCT)	50 uL	300.04	2.041	0.913	6.7-7.5	7.85
<i>S. Enteritidis</i> biofilm sin tratamiento (SBST)	50 uL	101.40	2.102	1.648	4.7-5.2	2.31
<i>S. Enteritidis</i> biofilm con tratamiento (SBCT)	50 uL	220.44	2.987	0.346	7.8-7.9	5.82

Nota: Tratamiento con *Lippia origanoides* quimiotipo Timol-Carvacrol II 0.18 mg/mL.

8.8 Construcción de librerías y secuenciación masiva de transcritos

Como todas las muestras de ARN superaron los criterios de calidad mínimos requeridos, se prosiguió a la realización de la construcción de librerías y secuenciación (Tabla 9 y 10). Los resultados evidencian como las muestras sobrepasaron un número de pb secuenciadas de 8.000 millones con un número total de lecturas por encima de 60 millones para cada lectura pareada. Así mismo, los puntajes Q20 (1 en 100) y Q30 (1 en 1000) relacionados logarítmicamente con la

probabilidad de error de llamada de base (P) 2: ($Q = -10 \log_{10} P$) superaron el 90%, lo cual validó la calidad de los resultados.

Tabla 9.

Estadísticas de las librerías de ARN

Nombre de la librería	Número de integridad de ARN (rin)	Radio ARNr	Conc. (ng/ul)	Conc. (nm)	Tamaño (pb)
PBST1	7.5	1.1	53.53	272.7	302
PBST2	7.6	1	56.64	274.91	317
PBST3	7.6	1	67.75	330.89	315
PBCT1	6.7	1	20.71	101.14	315
PBCT2	7.3	1	57.94	281.17	317
PBCT3	6.6	0.4	69.62	346.63	309
SBST1	4.7	0.3	68.07	333.52	314
SBST2	5.2	0.5	60.7	296.45	315
SBST3	4.7	0.4	64.78	317.41	314
SBCT1	7	1	88.08	468.91	289
SBCT2	7	1	77	380.92	311
SBCT3	7.9	1	50.45	249.55	311

Nota. Control de calidad de la secuenciación

Tabla 10.

Resultados del proceso de secuenciación masiva de librerías de ARN

Muestra	Número de bases secuenciadas (pb)	Número total de lecturas	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
PBCT1	9.240.452.852	61.19.,052	63.14	36.86	97.37	93.83
SBCT3	10.516.573.180	69.646.180	64.1	35.9	97.93	94.51
PBST3	11.340.060.438	75.099.738	62.62	37.38	97.95	94.58
PBCT2	10.382,234,218	68.756.518	63.51	36.49	97.9	94.6
PBST2	10.165.947.254	67.324.154	63.06	36.94	97.98	94.67
SBCT2	9.783.250.740	64.789.740	63.13	36.87	98.2	95.13

Muestra	Número de bases secuenciadas (pb)	Número total de lecturas	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
PBST1	8.681.517.896	57.493.496	63.83	36.17	98.03	94.77
SBCT1	9.862.950.050	65.317.550	56.58	43.42	98.27	95.0
PBCT3	9.330.537.640	61.791.640	63.31	36.69	98.06	94.85
SBST1	8.268.111.606	54.755.706	57.26	42.74	98.1	94.46
SBST2	7.889.054.796	52.245.396	57.67	42.33	98.01	94.26
SBST3	6.731.158.710	44.57.,210	57.44	42.56	98.18	94.64

Nota: GC (%): contenido de GC; AT (%): contenido de AT; Q20 (%): relación de bases que tienen un puntaje de calidad de phred superior a 20. · Q30 (%): relación de bases que tienen un puntaje de calidad de phred superior a 30.

Plataforma Illumina. Macrogen Inc.

8.9 Control de calidad de las secuencias generadas

Se logró determinar que, para el conjunto de sets de datos el 75% de las secuencias obtenidas eran duplicadas, mientras que el restante 25% correspondían a lecturas únicas. Así mismo, el contenido de GC era de 60%, con una longitud de 150 pb de cada una de las secuencias generadas. El porcentaje de alineamiento fue superior al 70 % para todas las muestras con un porcentaje de error cercano al 30%. Igualmente, el *Phred quality score* que permite la medida de la calidad de la identificación de las nucleobases generadas por secuenciación, se encontró superior a 30 en las diferentes muestras, lo que indica una probabilidad de error en llamada de base de 1 en 1000 y una precisión del 99,9%; lo cual concuerda con el *Per Base N Content*. inferior a 1.

La distribución de longitud de secuencia reflejó secuencias homogéneas de 150pb, así mismo se reflejó una calidad por secuencia superior a 30. La calidad de las secuencias por base se encontró dentro de la zona de buena calidad (28-36) y de manera homogénea. Así mismo, la calidad de secuencias por “baldosa” no evidenció fallos, lo cual indica que no quedaron burbujas

en la celda ni contaminantes en los reactivos durante la secuenciación. Lo enunciado previamente, permitió determinar que el proceso de secuenciación llevado a cabo por el laboratorio externo generó datos de alta calidad, lo cual favoreció el análisis de datos.

8.10 Diferencias generales en perfiles transcriptómicos en respuesta al tratamiento con el AE

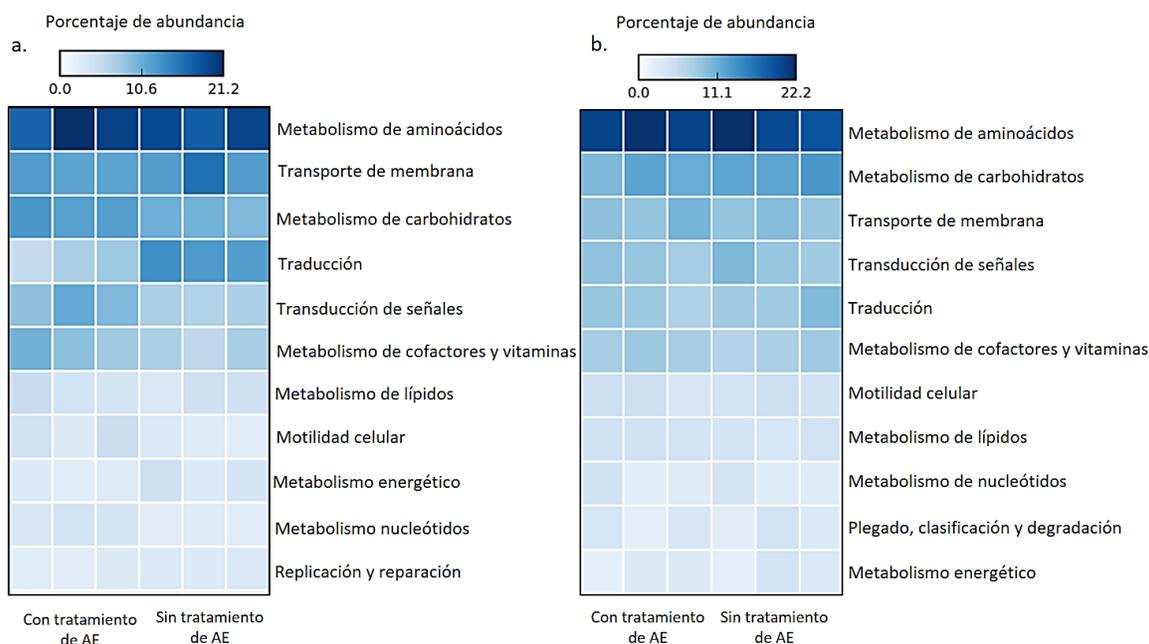
Se observó una diferencia en los perfiles de expresión transcripcional entre *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis* bajo tratamiento de LO. Timol-Carvacrol II, la cual se vio reflejada principalmente en el número de transcritos y genes identificados. En *P. aeruginosa* se determinó un total 26.244 genes y 26.806 transcritos en conjunto para todas las bases de datos evaluadas, en donde con un *Fold-change* (Fc) de 4 y un *E-value* de 6, se encontraron 40 genes regulados positivamente y 30 regulados negativamente bajo el tratamiento de LO. Timol-Carvacrol II. En contraste, en *S. Enteritidis* se identificaron 18.048 genes y 18.205 transcritos para todas las bases de datos evaluadas, de los cuales 85 genes se regularon positivamente y 63 negativamente bajo el tratamiento del AE seleccionado; Estos resultados sugieren un posible mayor efecto del AE sobre el metabolismo de *S. Enteritidis* en comparación con *P. aeruginosa*.

Igualmente, en las células en estado sésil de *S. Enteritidis* con tratamiento de LO. Timol-Carvacrol II, se observó una disminución en la expresión de genes relacionados con las rutas del metabolismo de aminoácidos, lípidos, carbohidratos, procesamiento de información ambiental como los transportadores ABC, motilidad celular y metabolismo energético, en comparación con las células no tratadas con el AE. En el caso de *P. aeruginosa*, el efecto del tratamiento del AE sobre las células en estado sésil se vio reflejado principalmente, sobre la expresión de genes vinculados al metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y transportadores ABC.

Cabe resaltar, como los dos microorganismos en estudio presentaron una mayor proporción de transcritos relacionados con el metabolismo de aminoácidos, como la alanina, aspartato y glutamato en *P. aeruginosa* o la lisina en *S. Enteritidis*. Este resultado es importante, debido a que previamente se ha evidenciado como los compuestos capaces de interferir con la biosíntesis de aminoácidos, tienen el potencial de inhibir el crecimiento celular tanto en microorganismos procariontas como eucariotas (Pletzer *et al.*, 2015) (Figura 14).

Figura 14.

Porcentajes de abundancia de las secuencias en (a) *S. Enteritidis* y (b) *P. aeruginosa* con y sin tratamiento de AE, relacionadas con las principales rutas metabólicas de la ortología KEGG.



Nota. Gráficos obtenidos mediante STAMP: *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles*

8.11 Expresión diferencial de genes en respuesta al tratamiento con el AE sobre *P. aeruginosa*

En el caso de *P. aeruginosa*, se detectaron un total 26.244 genes y 26.806 transcritos en conjunto para todas las bases de datos evaluadas. De 6.366 genes identificados en *P. aeruginosa* (Cao *et al.* , 2017) se encontró una disminución significativa en la expresión de 40 genes y un aumento en la expresión de 30 genes en presencia del AE tomando como base la información suministrada en la base de datos de la ortología KEGG. Los resultados obtenidos mostraron que dentro de los principales transcritos que se expresaron diferencialmente en presencia del AE (con valores de $p < 0.05$), se encuentran los relacionados el metabolismo de aminoácidos, de carbohidratos, proteínas de transporte de membrana y los sistemas reguladores de dos componentes.

Adicionalmente, es importante destacar que se presentaron algunos cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, metabolismo de nucleótidos y procesos de traducción de señales. También se encontraron diferencias en la expresión de genes relacionados con la adherencia al substrato y formación de *biofilm* tales como *cheY*, *fliC*, *bdIA*, *fleQ*, *fliI*, *Pgm*. Estos resultados, concuerdan con trabajos realizados por otros investigadores en dónde se ha demostrado que AE como el carvacrol y el timol pueden generar una inhibición de la expresión de genes relacionados con la motilidad y formación de *biofilm* en microorganismos patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 (Burt *et al.*, 2007; Nagoor *et al.*, 2017; Nazzaro *et al.*, 2013).

Así mismo, se encontró un aumento en la expresión del gen *pvdQ* con un log *Fc* de 4, un *E-value* de 6 y un porcentaje de identidad del 100% en las células con tratamiento de *LO* Timol-Carvacrol *II* en *P. aeruginosa*. Este gen codifica para una acilasa de AHL que puede actuar como

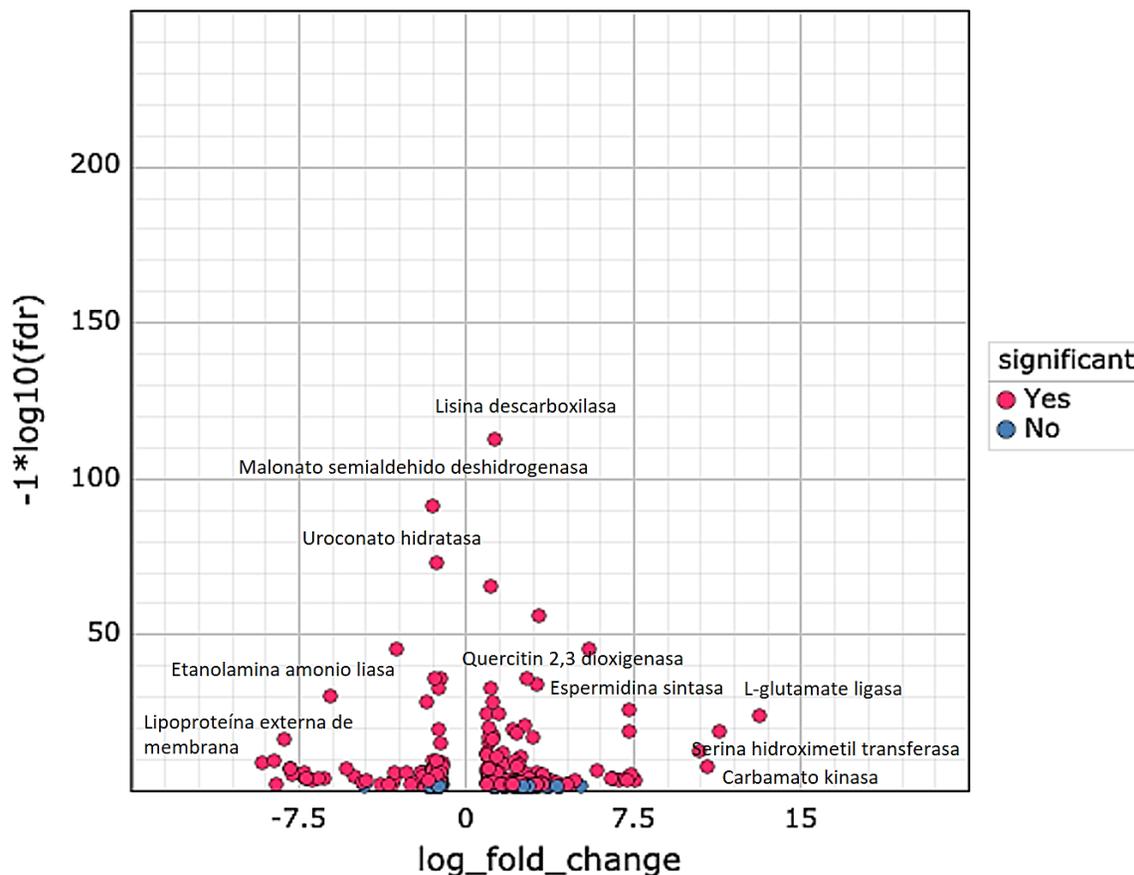
desactivador del *QS* (*Quorum quenching QQ*) debido a su capacidad de degradar las lactonas de N-acilhomoserin a de cadena larga (AHL); lo cual conduce a una disminución en la formación de *biofilm*. Adicionalmente, *PvdQ* participa en la homeostasis del hierro al desempeñar un papel en la biosíntesis de pioverdina, el principal sideróforo de *P. aeruginosa* (Jimenez et al., 2010).

Por otra parte, se encontró una disminución significativa en la expresión de genes relacionados con la producción de ATP, tales como las enzimas alcohol deshidrogenasa (citocromo c) y aldehído deshidrogenasa (NAD⁺). Sumado a lo anterior, se observó una expresión negativa en genes relacionados con la síntesis de alginato ($\log Fc -2$), un polímero lineal de ácido manurónico y ácido glucurónico que forma parte de la biopelícula secretada por *P. aeruginosa* como mecanismo de evasión y uno de los polisacáridos principales de la matriz del *biofilm* de este microorganismo patógeno (Paz-Zarza et al., 2019).

Finalmente, el análisis del $\log Fc$ mediante edgeR y un FDR <0.05 permitió determinar también el cambio en la expresión de algunos genes, tales como el de la lisina descarboxilasa, quercitin 2.3 dioxigenasa y espermidina sintasa la cual alcanzó un $\log Fc$ de 8. La expresión de este gen se destaca, teniendo en cuenta que la espermidina localizada en la superficie celular de *P. aeruginosa* la protege del tratamiento con antibióticos y el estrés oxidativo (Johnson *et al.*, 2012). Igualmente se evidenció la disminución en la expresión ($\log Fc -2$ a -4) de los genes de la etanolamina amonio liasa, malonato semialdehído deshidrogenasa y uroconato hidratasa relacionados con el metabolismo de aminoácidos (Figura 15), lo cual podría estar relacionado en este caso con el tratamiento del AE seleccionado. La tabla con todos los genes expresados diferencialmente en *P. aeruginosa* se muestra en anexos.

Figura 15.

Volcano plot de *P. aeruginosa* que representa la comparación en la expresión de genes de células con y sin tratamiento de AE, con un FDR <0.05.



Nota. Gráficos obtenidos mediante Trinotate web

8.12 Expresión diferencial de genes en respuesta al tratamiento con el AE sobre *S. Enteritidis*

En *S. Enteritidis* se detectaron 18.048 genes y 18.205 transcritos en conjunto para todas las bases de datos evaluadas. De 4.590 genes identificados en *S. Enteritidis* (ENA, 2020), se encontró una disminución significativa en la expresión de 85 genes y un aumento en la expresión de 63 bajo tratamiento del AE, tomando como base la información suministrada en la base de datos de la

ortología KEGG. Los resultados obtenidos permitieron determinar que dentro de los principales transcritos afectados por el tratamiento con el AE de *LO* Timol-Carvacrol II (con valores de $p < 0.05$), se encuentran los vinculados con la expresión de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos, proteínas de transporte de membrana y los sistemas reguladores de dos componentes. Así mismo, se observó una disminución en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos y los sistemas de secreción bacteriano tipo II, IV y VI vinculados con los procesos de motilidad bacteriana (Tabla 13).

Al igual que para *P. aeruginosa*, se observó una disminución en la expresión de genes relacionados con la motilidad y formación de *biofilm*, tales como el *cheY* que codifica para una proteína de quimiotaxis, el gen *motB* relacionado con la rotación del motor flagelar, uniendo maquinaria de torque a la pared celular (Morimoto & Minamino, 2014) y el gen *BDLA*, un regulador de quimiotaxis esencial para la dispersión del *biofilm* (Morgan *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha evidenciado que la supresión de este último genera la disminución de la virulencia de cepas de *Salmonella* (Gwee *et al.*, 2019). Se evidenció también una disminución en la expresión del gen *ppx* (Exopolifosfatasa) ($\log Fc -3$) y un porcentaje de identidad del 81.25%. Estudios previos han demostrado que una disminución de la expresión de genes relacionados con la polifosfatasa como el *ppx*, generarían una posible disminución de la comunicación celular mediada por *QS* y la formación de *biofilm* de microorganismos como *Porphyromonas gingivalis* (Chen *et al.*, 2002), lo cual podría estar vinculado en este estudio a la formación de *biofilm* de especies bacterianas como *Salmonella* y el posible efecto del AE *LO* Timol-Carvacrol II.

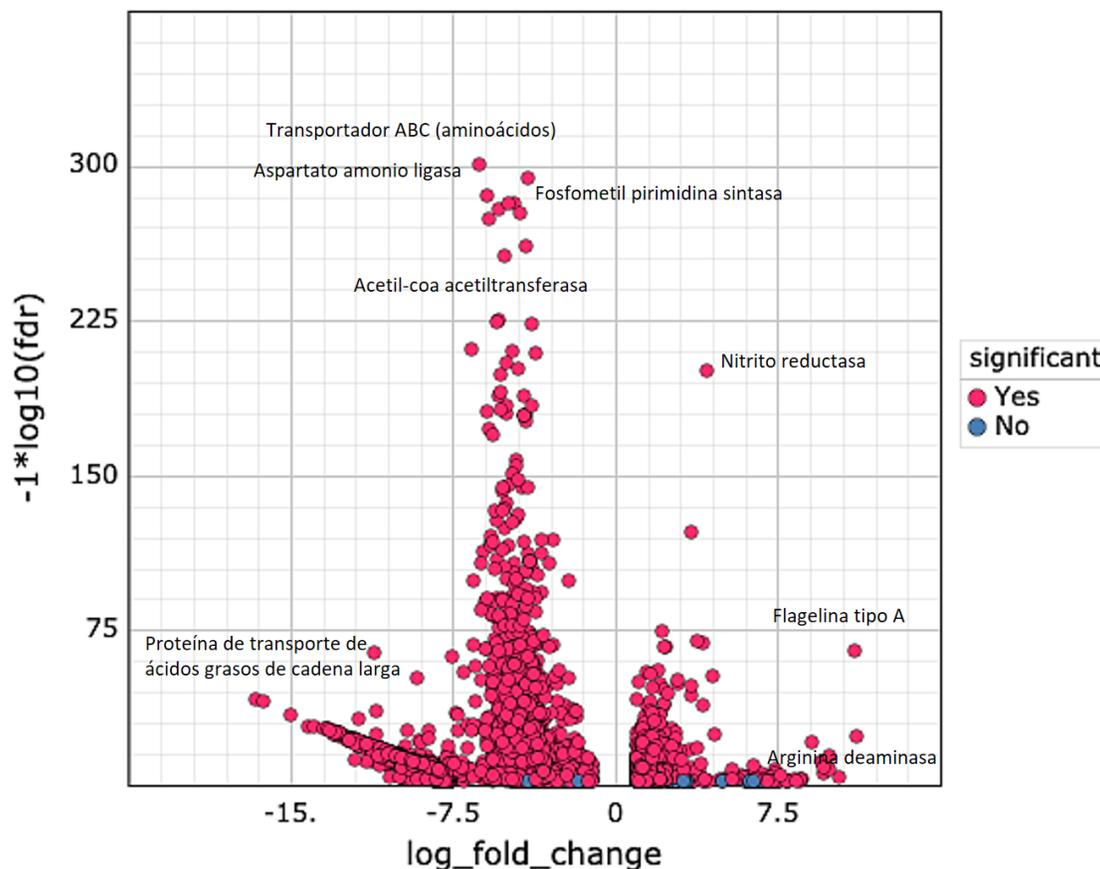
Adicionalmente, se observó una disminución en la expresión de genes relacionados con el sistema de transporte ABC, el complejo ATPasa y el metabolismo de carbohidratos. Estos resultados son congruentes con los resultados de Yang en 2015, en dónde se menciona que los

compuestos de los AE toman como blanco la pared celular y membrana citoplasmática, lo cual permite una permeabilización seguida a la pérdida de iones, pérdida del potencial de membrana, colapso de la bomba de protones y agotamiento del ATP y por ende, causan la inhibición del crecimiento de los microorganismos (Yang *et al.*, 2015).

El análisis del log *Fc* mediante edgeR y un FDR <0.05, permitió determinar también el cambio en la expresión de algunos genes. En comparación con *P. aeruginosa*, en *S. Enteritidis* se observó una mayor proporción de genes con expresión negativa (Figura 16), dentro de los cuales se resalta un gen que codifica para un transportador ABC relacionado con el metabolismo de aminoácidos, al igual que la aspartato amonio ligasa o la fosfometil pirimidina sintasa vinculada al proceso de síntesis de pirimidinas, todos ellos con un valor de log *Fc* cercano a -5. Igualmente, se observó una disminución significativa de la expresión del gen que codifica para la Acetil-Coa acetiltransferasa vinculada a la beta oxidación de ácidos grasos y el proceso catabólico del fenilacetato, todo esto vinculado al posible efecto del AE sobre las células bacterianas en estado de *biofilm* en *S. Enteritidis*. La tabla con todos los genes expresados diferencialmente en *S. Enteritidis* se muestra en Anexos.

Figura 16.

Volcano plot de *S. Enteritidis* que representa la comparación en la expresión de genes de células con y sin tratamiento de AE, con un FDR <0.05.



Nota. Gráficos obtenidos mediante Trinotate web

8.13 Rutas metabólicas afectadas por el tratamiento de *LO* Timol-Carvacrol II sobre *P. aeruginosa*.

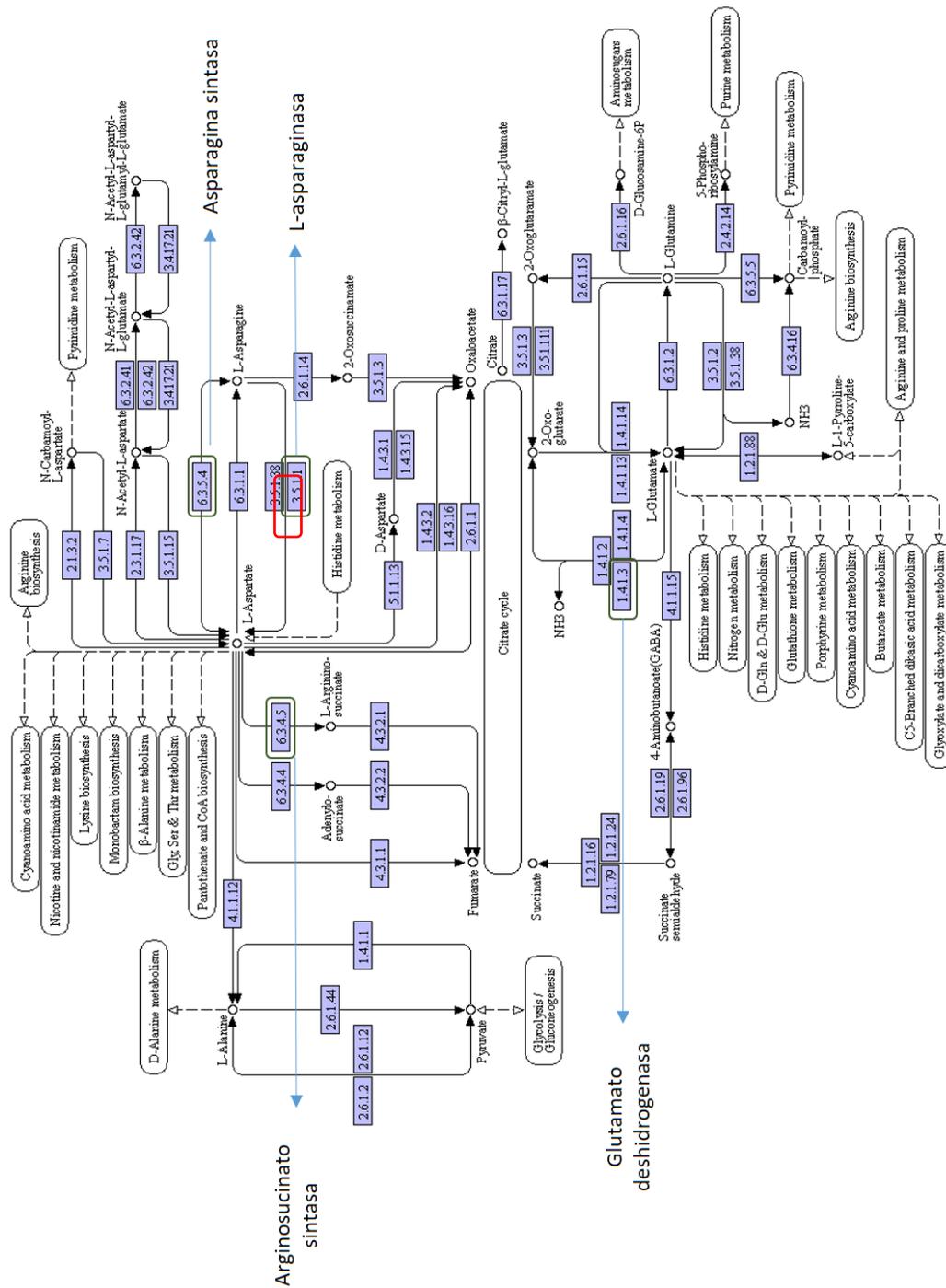
Dentro de las principales rutas metabólicas de *P. aeruginosa* que se encuentran afectadas por el tratamiento de *LO* Timol-Carvacrol II, se encuentran las rutas del metabolismo de aminoácidos como alanina, aspartato y glutamato, enzimas relacionadas con el proceso de

glicolisis / gluconeogénesis y transportadores ABC. En la figura 17, se resaltan en recuadros verdes los genes con expresión negativa y en rojo con expresión positiva en la ruta del metabolismo de Alanina, Aspartato y Glutamato.

El glutamato y la asparagina son derivados intermedios del metabolismo central, principalmente el ciclo del ácido cítrico en uno o dos pasos. Lo anterior en este caso puede estar relacionado con la disminución de algunas enzimas vinculadas con el proceso de glucolisis. La importancia y la complejidad de las funciones de estos aminoácidos corresponden a su proximidad al metabolismo central. El nitrógeno inorgánico (amoníaco) se asimila en glutamato, que es el principal donante de nitrógeno intracelular. El glutamato es un precursor de la arginina, la glutamina, la prolina y las poliaminas. La degradación del glutamato también es importante para la supervivencia en ambientes ácidos, y los cambios en la concentración de glutamato acompañan los cambios en la osmolaridad, lo cual en este estudio puede darse por el efecto del AE sobre el microorganismo. El aspartato es un precursor de asparagina, isoleucina, metionina, lisina, treonina, pirimidinas, NAD, pantotenato, un donante de nitrógeno para la síntesis de arginina y purina y un importante efector metabólico que controla la interconversión de intermedios C3 y C4 y la actividad del sistema de dos componentes *DcuS-DcuR* (Reitzer, 2004).

Figura 17.

Efecto del AE sobre la expresión de genes de las rutas de metabolismo de Alanina, Aspartato y Glutamato en *P. aeruginosa*



Nota. Gráficos obtenidos mediante MG-RAST (KEGG MAPPER)

Los resultados obtenidos concuerdan con el estudio de Pletzer en 2015 en donde se evidenció que los compuestos capaces de interferir con la biosíntesis de aminoácidos tienen el potencial de inhibir el crecimiento celular tanto en los microorganismos procariotas como en los eucariotas (Pletzer *et al.*, 2015). Igualmente, se ha encontrado que los transportadores ABC se encuentran implicados tanto en la absorción de antibióticos como en la de aminoácidos y juegan un papel importante en la absorción nutricional de sustratos del medio ambiente (Tanaka *et al.*, 2018). Generalmente consisten en dos dominios permeasa y varios dominios de unión a ATP que son responsables del suministro de energía.

La translocación de moléculas a través de las membranas se logra mediante los dos dominios transmembrana hidrófobos tras la hidrólisis de ATP. La especificidad del sustrato de los importadores de ABC está determinada por su (s) proteína (s) de unión al sustrato, que elimina solutos en el periplasma y los entrega a la permeasa del translocador. Así mismo, estos transportadores se han asociado con la virulencia de bacterias patógenas, competencia genética y adherencia (Pletzer *et al.*, 2015). Es posible que el estrés oxidativo inducido por el AE, genere una alteración en la producción de energía y el metabolismo de aminoácidos de *P. aeruginosa* como lo han demostrado otros investigadores (Wan *et al.*, 2019). En la tabla 11 se describen principales genes afectados por el tratamiento de *LO* quimiotipo Timol-Carvacrol II *P. aeruginosa*. y las principales rutas metabólicas a los cuales se encuentran vinculados según la ortología KEGG.

Tabla 11.

Principales genes afectados por el tratamiento de LO quimiotipo Timol-Carvacrol II sobre el biofilm de P. aeruginosa. y rutas metabólicas a los cuales se encuentran vinculados.

RUTA METABÓLICA (NIVEL 2 KO)	RUTA METABÓLICA (NIVEL 3 KO)	GENES CON EXPRESIÓN NEGATIVA	GENES CON EXPRESIÓN POSITIVA
Metabolismo de aminoácidos	Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato [PATH:ko00250]	<i>asnB</i> ; ASNS; asparagina sintasa (hidrolisis de glutamina) glutamato deshidrogenasa (NAD(P)) argG; argininosuccinato sintasa	<i>AnsA</i> , <i>ansB</i> ; L-asparaginasa
Metabolismo de Carbohidratos	Glicolisis / Gluconeogenesis [PATH:ko00010]	<i>pfkA</i> ; PFK; 6-fosfofructoquinasa 1 <i>aceE</i> ; piruvato deshidrogenasa componente E1 <i>gapN</i> ; gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa (NADP)	
Procesamiento de información ambiental	Transportadores ABC	<i>modB</i> ; transporte de molibdato, proteína con sistema permeasa <i>potI</i> ; transporte de putresina, proteína con sistema permeasa <i>pstS</i> ; transporte de fosfato, proteína de unión a sustrato <i>yddA</i> ; transportador putativo "ATP-binding cassette"	<i>gsiA</i> ; transporte de glutation, proteína de unión a ATP <i>hisJ</i> ; transporte de histidina, proteína de unión a sustrato
Procesamiento de información ambiental	Sistema de dos componentes	<i>pmm</i> ; fosfomanomutasa <i>algQ</i> ; activador transcripcional biosíntesis de alginato	
Motilidad celular	Quimiotaxis bacteriana	<i>bdIA</i> ; proteína de dispersión de <i>biofilm</i>	

Nota. Principales genes expresados tomando como base la ortología KEGG

8.14 Rutas metabólicas afectadas por el tratamiento de *LO* Timol-Carvacrol *II* sobre *S. Enteritidis*

En el análisis de datos en *S. Enteritidis*, se presentó una alteración con respecto al control de la expresión de los genes relacionados con el proceso de fosforilación oxidativa, biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis de lisina, transportadores ABC y del sistema de dos componentes. Dentro de los genes relacionados con el sistema de transporte ABC, sobresalen los relacionados con el transporte de aminoácidos y azúcares. Igualmente, se observó un aumento en la expresión de un gen relacionado con el transporte de antibióticos (ABC-2. AB. P; sistema de transporte de antibióticos) el cual podría aumentar la velocidad de flujo del AE a las células bacterianas.

Adicional a lo que se describió en los resultados obtenidos en *P. aeruginosa*, es bien conocido que los transportadores ABC son blanco para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos, debido a que juegan un papel para la entrega del fármaco en la célula bacteriana en lugar de ser el objetivo de los compuestos antimicrobianos (Som & Bogen, 2004).

Así mismo, se presentó una disminución en la expresión de los genes relacionados con los sistemas de dos componentes, los cuales son circuitos de señalización que permiten a los organismos tanto procariotas como eucariotas detectar estímulos ambientales y responder a estos de manera adaptativa. La percepción y procesamiento intracelular de los estímulos se lleva a cabo por circuitos moleculares que detectan y amplifican las señales, permitiendo la generación de respuestas específicas (Álvarez, 2016).

Dentro de los resultados obtenidos cabe resaltar el relacionado con la respiración con tetrionato (*ThR*, *ThA*, *ThB* y *ThC*). Se ha evidenciado que este compuesto permite una mayor producción de energía y competitividad en especies de *Salmonella* al ser usado como un aceptor

final de electrones; lo cual puede estar relacionado en este caso con el estrés oxidativo al que es sometido el microorganismo bajo el tratamiento con el AE (Fàbrega & Vila, 2013; Khan, 2014).

Igualmente, se observó una disminución en la expresión de genes relacionados con la Citocromo C oxidasa vinculada al proceso de fosforilación oxidativa, lo cual afectaría la generación de ATP. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por diferentes autores en estudios previos (Issa *et al.*, 2019; Nazzaro *et al.*, 2013), en dónde se afirma que un efecto de los AE sobre diferentes bacterias patógenas afectan la generación de ATP debido a que algunos componentes tales como el eugenol, carvacrol y cinamaldehído, son capaces de inhibir la actividad de ATPasa unida a membrana y por ende generar una alteración del crecimiento bacteriano. Adicionalmente, los AE alteran la membrana celular y alteran el equilibrio intracelular y externo del ATP, de modo que el ATP se pierde a través de la membrana. En la Figura 18 se resaltan en recuadros verdes los genes con expresión negativa y en rojo con expresión positiva en la vía de la fosforilación oxidativa y en la tabla 12 se describen los principales genes afectados por el tratamiento de *LO* quimiotipo Timol-Carvacrol II *S. Enteritidis* y las principales rutas metabólicas a los cuales se encuentran vinculados según la ortología KEGG.

Tabla 12.

Principales genes afectados por el tratamiento de LO quimiotipo Timol-Carvacrol II sobre el biofilm de *S. Enteritidis* y rutas metabólicas a los cuales se encuentran vinculados

Ruta Metabólica (NIVEL 2 KO)	Ruta Metabólica (NIVEL 3 KO)	Genes con expresión negativa	Genes con expresión positiva
Metabolismo energético	Fosforilación oxidativa	<i>cyoC</i> ; subunidad III citocromo o ubiquinol oxidasa <i>cyoB</i> ; subunidad I citocromo o ubiquinol oxidasa <i>cdpd1</i> :c diguanidil monosfosfato fosfodiesterasa	<i>nuoA</i> , NADH-quinona oxidoreductasa subunidad A
Metabolismo lipídico	Biosíntesis de ácidos grasos	<i>fabB</i> ; 3-oxoacil-[proteína transportadora acil] sintasa I <i>fabF</i> ; 3-oxoacil -[proteína transportadora acil] sintasa II <i>fadE</i> ; acil-CoA deshidrogenasa	
Metabolismo de aminoácidos	Biosíntesis de lisina	<i>LYS1</i> ; sacaropina deshidrogenasa (NAD ⁺ , formador L-lisina) <i>dapF</i> ; diaminopimelato epimerasa <i>dapC</i> ; N-succinil diaminopimelato aminotransferasa <i>sucA</i> ; 2-oxoglutarato deshidrogenasa componente E1 <i>sucB</i> ; 2-oxoglutarato deshidrogenasa componente E2 (dihidrolipoamida succiniltransferasa)	
Procesamiento de información ambiental	Transportadores ABC	<i>yejF</i> ; sistema de transporte, microcina C, proteína de unión a ATP <i>fliY</i> ; cistina, sistema de transporte de unión a sustrato <i>aapP</i> : sistema general de transporte de amino acidos ABC <i>bztD</i> : glutamato/glutamina/aspartato/transporte de asparagina	<i>pstB</i> ; Importación de fosfato de proteína de unión a ATP ABC-2.ABP; transporte de antibióticos, sistema proteína permeasa

Ruta Metabólica (NIVEL 2 KO)	Ruta Metabólica (NIVEL 3 KO)	Genes con expresión negativa	Genes con expresión positiva
		<p><i>livG</i>; proteína de unión a ATP de transporte de aminoácidos de cadena ramificada de alta afinidad</p> <p><i>aapJ</i>: proteína periplásmica general de unión a L-aminoácidos AapJ</p> <p><i>bztA</i>: glutamato / glutamina / aspartato / proteína de unión a asparagina BztA;</p> <p><i>yejA</i>: actividad transportadora transmembrana de péptidos, proteína no caracterizada YejA</p> <p><i>araF</i>; transporte L-arabinosa, sistema de transporte de unión a sustrato</p> <p><i>araH</i>; transporte de L-arabinosa, proteína de sistema permeasa</p> <p><i>msbA</i>; exportación de lípidos A proteína ATP / permease MsbA</p> <p><i>aapQ</i>, sistema general de transporte de aminoácidos L permease proteína AapQ</p> <p><i>BztB</i>: glutamato / glutamina / aspartato / asparagina permeasa sistema de transporte BztB</p>	<p><i>thiP</i>; transporte de tiamina, sistema proteína permeasa</p> <p><i>ugpA</i>;</p> <p>transporte sn-glicerol 3-fosfato, sistema proteína permeasa</p> <p><i>mexB</i>: Proteína de resistencia a múltiples fármacos MexB</p>
Procesamiento de información ambiental	Sistema de dos componentes	<p><i>ttrA</i>: tetracionato reductasa subunidad A</p> <p><i>fdnI</i>: formato deshidrogenasa-N, subunidades gamma</p> <p><i>pgtC</i>: transporte fosfoglicerato, proteína regulatoria PgtC</p> <p><i>CitB/CitA</i> sensor histidin quinasa</p> <p><i>ttrC</i>: tetracionato reductasa subunidad C</p> <p><i>citX</i>: holo-ACP sintasa</p> <p><i>ttrB</i>: tetracionato reductasa subunidad B</p> <p><i>arnB</i>: pmrH UDP-4-amino-4-deoxi-L-arabinosa-oxoglutarato aminotransferasa</p> <p><i>frdA</i>, <i>frdA</i>: fumarato reductasa subunidad flavoproteína</p> <p><i>LuxR</i>: activador transcripcional</p> <p><i>Ppx</i>: exopolifosfatasa</p>	<p><i>quiP</i>: Acil-homoserin lactona acilasa;</p> <p><i>LasR</i>: regulador transcripcional</p> <p><i>RhlR</i>: proteína reguladora</p>

Ruta Metabólica (NIVEL 2 KO)	Ruta Metabólica (NIVEL 3 KO)	Genes con expresión negativa	Genes con expresión positiva
Metabolismo de carbohidratos	Metabolismo de azúcares y nucleótidos	<i>murG</i> : UDP-N-acetilglucosamina--N-acetilmuramil-(pentapeptido) pirofosforil-undecaprenol N-acetylglucosamina transferasa; <i>murC</i> : UDP-N-acetilmuramato--L-alanina ligasa <i>murA</i> : UDP-N-acetylglucosamina 1-carboxiviniltransferasa arabinosa 5-fosfato isomerasa <i>rfaQ</i> : lipopolisacárido core heptosiltransferasa RfaQ.	
Motilidad celular	Quimiotaxis bacteriana	<i>bdcA</i> : proteína mediadora de dispersión de unión de biopelícula <i>ycbf</i> : chaperona fimbrial no caracterizada YcbF <i>cheY</i> : proteína de quimiotaxis CheY <i>bdIA</i> : proteína de dispersión de <i>biofilm</i>	

Nota. Principales genes expresados tomando como base la ortología KEGG

8.15 Posibles mecanismos de acción del AE de *LO* Timol-Carvacrol II sobre el *biofilm* de *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis*

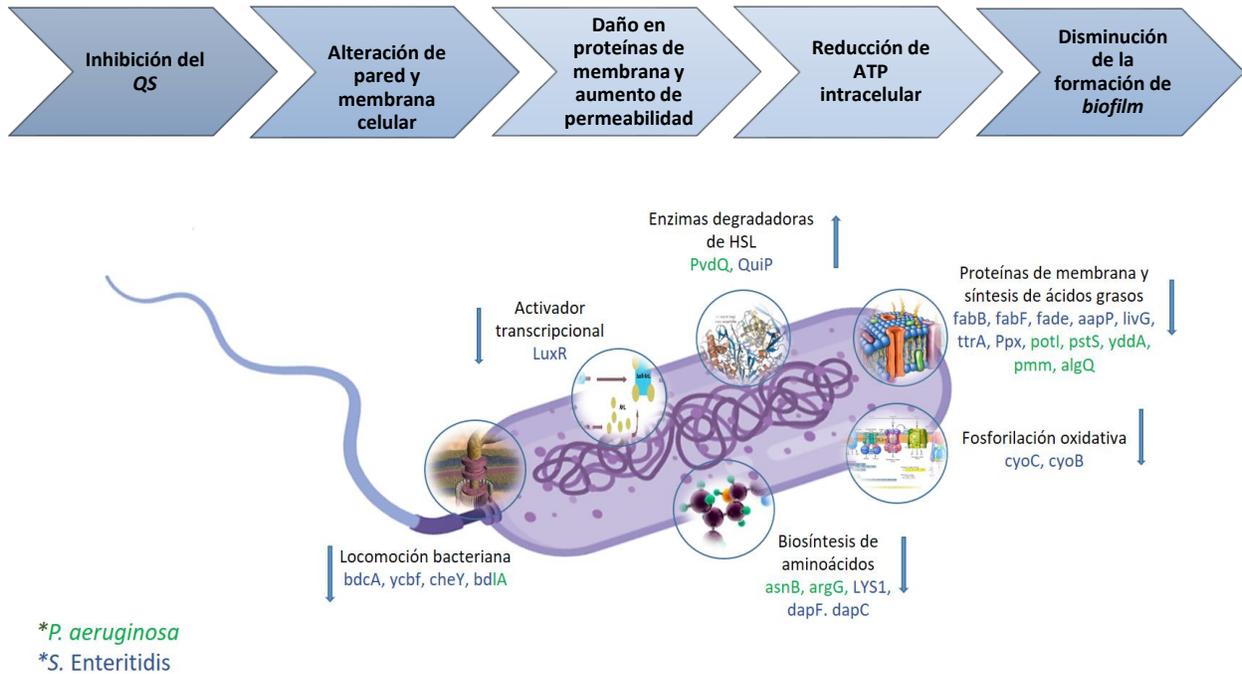
Los resultados sugieren que, en términos generales el AE de *LO* Timol-Carvacrol II tiene efectos compartidos y comunes sobre el *biofilm* de ambas bacterias, por lo que los mecanismos de acción podrían ser similares, aunque con algunas diferencias específicas para cada bacteria. En primer lugar, *LO* Timol-Carvacrol II podría ocasionar una alteración de la pared y membrana celular lo que se vió evidenciado en la disminución de la expresión de genes relacionados con transportadores asociados a membrana como el Sistema general de transporte de amino ácidos ABC, síntesis de ácidos grasos (*fabB* y *fabF*) y lipopolisacáridos (core heptosiltransferasa *RfaQ*),

lo que por consiguiente refleja un daño en las proteínas de membrana y una reducción en la síntesis de ATP intracelular. Así mismo, se produce un aumento en la expresión de genes vinculados con el bloqueo de sistemas de comunicación celular tipo *QS* como las acilasas de AHL (*pvdQ* y *quiP*) y una disminución en la expresión de gen *gacA* que actúa como control positivo del autinductor N- butiril- homoseril- lactona, una de las moléculas empleados por *P. aeruginosa* para la comunicación celular via *QS*.

Por otra parte, se genera una disminución en la expresión de genes vinculados con mecanismos de motilidad bacteriana como flagelo y pilis, síntesis de ácidos grasos (principalmente en *S. Enteritidis*), transportadores de membrana asociados con el transporte de aminoácidos o azúcares, producción de exopolifosfatasa (*ppx*) involucrada en la producción de factores de virulencia asociados con la infección aguda (factores promotores de la motilidad, pioverdina y las Acil-Homoserina-Lactonas o AHL) e infección crónica (ramnolípidos y formación de biofilm) (Gallarato et al., 2014) y finalmente se da una disminución en la producción de alginato (en *P. aeruginosa*). Todo lo anterior llevaría finalmente, a una disminución en los procesos de adherencia y formación de *biofilm* de los microorganismos patógenos en estudio (Figura 19 y 20).

Figura 19.

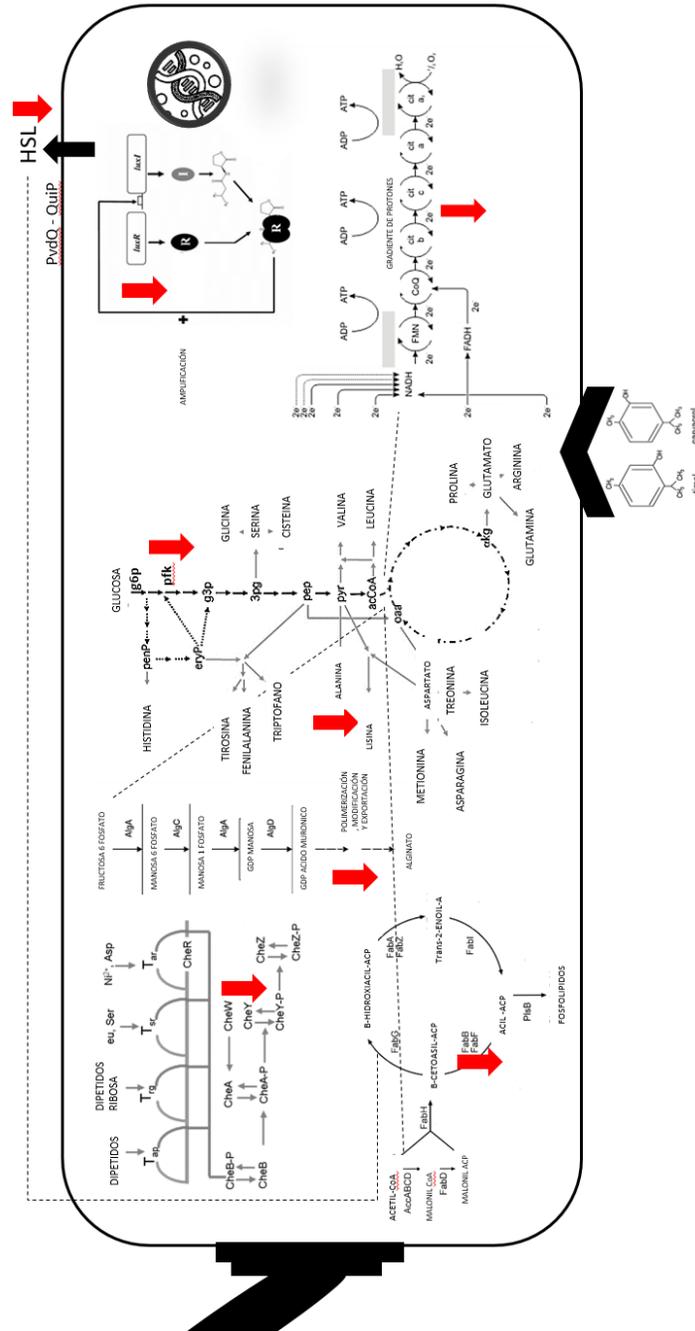
Posibles mecanismos efectores del AE de LO Timol - Carvacrol II sobre el biofilm de P. aeruginosa y S. Enteritidis.



Nota. En colores se resaltan las diferencias entre los dos microorganismos

Figura 20.

Posibles mecanismos efectores del AE de LO Timol - Carvacrol II sobre el biofilm de *P. aeruginosa* y *S. Enteritidis* a nivel de rutas metabólicas.



Nota. Vinculación final de las diferentes rutas metabólicas alteradas por el tratamiento, en rojo se detalla la disminución en la expresión de algunos genes.

9. Conclusiones

El AE de *LO* Timol-Carvacrol II, presentó el mayor efecto antimicrobiano sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 a una CMI de 0.75 mg/mL para ambas bacterias, inhibición del *biofilm* de 38% y 68% para *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 respectivamente, y CMI de *QS* a 0.3 mg/mL sobre el microorganismo reportero *C. violaceum* CV026.

Los resultados sugieren que el efecto del tratamiento con el AE de *LO* Timol-Carvacrol II sobre los perfiles transcriptómicos de *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 en estado sésil, consisten principalmente en cambios significativos en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético, de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, procesamiento de información ambiental (sistemas de dos componentes y transportadores ABC) y proteínas de membrana, que en conjunto, podrían explicar el efecto antimicrobiano, anti-*QS* y antibiofilm del AE observado sobre ambas bacterias.

Las diferencias en los perfiles transcriptómicos de *S. Enteritidis* ATCC13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 en estado sésil bajo tratamiento de *LO* Timol-Carvacrol II, se vieron reflejadas principalmente en el número de genes expresados y su relación con rutas metabólicas como la síntesis de ácidos grasos, quimiotaxis bacteriana y el sistema de dos componentes.

La acción inhibitoria del AE de *LO* Timol-Carvacrol II, ocasionó una disminución significativa en la expresión de genes relacionados con la formación de *biofilm* y comunicación

celular tipo *QS* de *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *P.-aeruginosa* ATCC 27853 como *ppx*, *bdIA* *pgm*, *pvdQ*, *quiP*, *gacA*, *cheY*, *motB*, *fliC*, *fleQ* y *fliI*, confirmando la hipótesis planteada para el estudio.

El tratamiento de *LO* Timol-Carvacrol *II* puede ocasionar una alteración de la pared y membrana celular, lo que se refleja en el daño de las proteínas de membrana y una reducción en la síntesis de ATP. Así mismo, se produce un aumento en la expresión de genes vinculados con el bloqueo del sistema de comunicación celular tipo *QS* y una disminución en la expresión de genes vinculados con mecanismos de motilidad bacteriana, transportadores de membrana, lo cual llevaría a una disminución en los procesos de adherencia y formación de *biofilm*.

El análisis de los perfiles transcriptómicos obtenidos en este estudio sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 con tratamiento de AE como *LO* Timol-Carvacrol *II*, permitió identificar genes y su posible función en las rutas metabólicas que podrían servir como base para el desarrollo de nuevos estudios enfocados en la determinación de dianas terapéuticas y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

10. Recomendaciones

Los estudios enfocados en la evaluación del efecto sinérgico de los AE con antimicrobianos convencional y sobre *biofilms* multiespecie, podrían aportar valiosa información para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas contra microorganismos patógenos resistentes formadores de *biofilm*, como los evaluados en este trabajo.

Se recomienda continuar estudios de los mecanismos de acción de los AE, mediante otras herramientas ómicas, como la proteómica y la metabolómica, para establecer una correlación con los resultados obtenidos en el presente estudio, mediante transcriptómica.

Referencias bibliográficas

- Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2017). Control of Biofilm Formation: Antibiotics and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3), 1–16.
- Ali-Ahmad, A., Fadel, F., Sebban-Kreuzer, C., Ba, M., Péliissier, G. D., Bornet, O., Guerlesquin, F., Bourne, Y., Bordi, C., & Vincent, F. (2017). Structural and functional insights into the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11361-3>
- Aline, C., Martins, L., Mayara, F., Marco, C., Denise, C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*, 1–12.
- Álvarez, A. F. (2016). Características y funcionamiento de los Sistemas de Dos Componentes de organismos procariotas y eucariotas. *Química Viva*, 15(3), 11–27.
- Alves, F., Natan, D. A., Pimentel, D. J., Uelinton, F., & Pinto, M. (2016). Acyl homoserine lactone - based quorum sensing stimulates biofilm formation by *Salmonella Enteritidis* in anaerobic conditions. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1313-6>
- Ammar, S. S. M., Mokhtaria, K., Amar, A. A., Tahar, B. B., Moulay, D., Mohamed, H. S., & Laid, B. (2016). Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Cinnamomum aromaticum* Essential Oil Against Four Enteropathogenic Bacteria Associated with Neonatal Calve's Diarrhea. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(1), 24–30. <https://doi.org/10.3923/ajava.2017.24.30>
- Ana, M., Montiel, J., Zapata, B., Durán, C., Betancur, L., & Stashenko, E. (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: Composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(6), 878–884.

http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L355477476%5Cnhttp://memorias.ioc.fiocruz.br/104_6_1150.pdf

Asfour, H. Z. (2017). Antiquorum sensing natural compounds. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2017.02.001>

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Banu, S. F., Rubini, D., Rakshitaa, S., Chandrasekar, K., Murugan, R., Wilson, A., Gowrishankar, S., Pandian, S. K., & Nithyanand, P. (2017). Antivirulent properties of underexplored Cinnamomum tamala essential oil and its synergistic effects with DNase against pseudomonas aeruginosa biofilms - An in vitro study. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01144>

Basavaraju, M., Sisnity, V. S., Palaparthi, R., & Addanki, P. K. (2016). Quorum quenching: Signal jamming in dental plaque biofilms. *Journal of Dental Sciences*, 11(4), 349–352. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2016.02.002>

Becton Dickinson. (2013). Brain Heart Infusion (BHI) agar. *Becton Dickinson*, April, 24–26. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>

Becton Dickinson. (2019). Tryptic Soy Broth. *Becton Dickinson*, March, 5–7. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=30505>

Berdejo, D., Chueca, B., Pagán, E., Renzoni, A., Kelley, W. L., Pagán, R., & Garcia-Gonzalo, D. (2019). Sub-Inhibitory doses of individual constituents of essential oils can select for staphylococcus aureus resistant mutants. *Molecules*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/molecules24010170>

Betancourt, L., Phandanuvong, V., & Patiño, R. (2012). COMPOSITION AND BACTERICIDAL ACTIVITY AGAINST BENEFICIAL AND PATHOGENIC BACTERIA OF OREGANO ESSENTIAL OILS FROM FOUR CHEMOTYPES OF Origanum AND Lippia GENUS. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 59(I), 21–31.

- Beyer, P., & Paulin, S. (2020). Priority pathogens and the antibiotic pipeline: An update. *Bulletin of the World Health Organization*, 98(3), 151. <https://doi.org/10.2471/BLT.20.251751>
- Bjarnsholt, T., Moser, C., Jensen, P., & Hoiby, N. (2011). *Biofilm Infection*. Springer.
- Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2011). Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6), 2655–2661. <https://doi.org/10.1128/AAC.00045-11>
- Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T. A., Woertman, J., & Veldhuizen, E. J. A. (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in chromobacterium violaceum and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS ONE*, 9(4), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093414>
- Burt, S. A., Van Der Zee, R., Koets, A. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in Escherichia coli O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4484–4490. <https://doi.org/10.1128/AEM.00340-07>
- Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E., Di Stefano, A., Cerasa, L. S., Marinelli, L., Turkez, H., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Robuffo, I., & Cellini, L. (2015). Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan. *PLoS ONE*, 10(4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120937>
- Caldas A. Liliana. (2015). Artículo de revisión BACTERIAS-BIOFILMS Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA. *Revista Facultad Ciencias de La Salud.Universidad Del Cauca*, 17(1), 20–27.
- Camele, I., Elshafie, H. S., Caputo, L., & De Feo, V. (2019). Anti-quorum Sensing and Antimicrobial Effect of Mediterranean Plant Essential Oils Against Phytopathogenic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10(November), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02619>
- Cánovas, D., Fletcher, S. A., Hayashi, M., & Csonka, L. N. (2001). Role of trehalose in growth at high temperature of Salmonella enterica serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 183(11), 3365–3371. <https://doi.org/10.1128/JB.183.11.3365-3371.2001>

- Cao, H., Lai, Y., Bougouffa, S., Xu, Z., & Yan, A. (2017). Comparative genome and transcriptome analysis reveals distinctive surface characteristics and unique physiological potentials of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3842-z>
- Cárcamo, G., Silva, M., Becerra, J., Urrutia, H., Sossa, K., & Paz, C. (2014). INHIBITION OF QUORUM SENSING BY DRIMANE LACTONES FROM CHILEAN FLORA. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *3*, 2622–2624.
- CDC. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*.
- Cerqueira, L., Oliveira, J. A., Nicolau, A., Azevedo, N. F., & Vieira, M. J. (2013). Biofilm formation with mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa*/*Escherichia coli* on silicone using artificial urine to mimic urinary catheters. *Biofouling*, *29*(7), 829–840. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.807913>
- Chen, W., Palmer, R. J., & Kuramitsu, H. K. (2002). Role of polyphosphate kinase in biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, *70*(8), 4708–4715. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4708-4715.2002>
- Chin, K. C. J., Taylor, T. D., Hebrard, M., Anbalagan, K., Dashti, M. G., & Phua, K. K. (2017). Transcriptomic study of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhi biofilm. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4212-6>
- Choo, J. H., Rukayadi, Y., & Hwang, J. K. (2006). Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology*, *42*(6), 637–641. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01928.x>
- Costerton, W., & Balaban, N. (2008). *Control of Biofilm Infection by Signal Manipulation* (2nd ed.). Springer Series on Biofilms. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73853-4> e-ISBN
- Dale, R., Sj, A., Chapman, B. A., Rowe, J., Tomkins-tinch, C. H., Valieris, R., Caprez, A., Haudgaard, M., Cokelaer, T., Beauchamp, K. A., Pedersen, B. S., Raden, M., Heeringen, S. J. Van, Soranzo, N., Pantano, L., Wolff, J., Holtgrewe, M., Salatino, A. E., Dirmeier, S., ... Johannes, K. (2017). *Bioconda : A sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences*. 1–13.

- Dantas, S. T. A., Rossi, B. F., Bonsaglia, E. C. R., Castilho, I. G., Hernandez, R. T., Fernandes, A., & Rall, V. L. M. (2018). Cross-Contamination and Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis on Various Cutting Boards. *Foodborne Pathogens and Disease*, *15*(2), 81–85. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2341>
- Davenport, P. W., & Griffin, J. L. (2015). Quorum Sensing Is Accompanied by Global Metabolic Changes in the Opportunistic Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *197*(12), 2072–2082. <https://doi.org/10.1128/JB.02557-14>
- Deng, X., Li, Z., & Zhang, W. (2012). Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology*, *30*(1), 311–315. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.11.001>
- Deryabin, D., Galadzhieva, A., Kosyan, D., & Duskaev, G. (2019). Plant-derived inhibitors of AHL-mediated quorum sensing in bacteria: Modes of action. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225588>
- Desin, T. S., Lam, P. K. S., Koch, B., Mickael, C., Berberov, E., Wisner, A. L. S., Townsend, H. G. G., Potter, A. A., & Köster, W. (2009). *Salmonella enterica* serovar enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for but facilitates rapid systemic spread in chickens. *Infection and Immunity*, *77*(7), 2866–2875. <https://doi.org/10.1128/IAI.00039-09>
- Ding, X., Yin, B., Qian, L., Zeng, Z., Yang, Z., Li, H., Lu, Y., & Zhou, S. (2011). Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Medical Microbiology*, *60*(12), 1827–1834. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.024166-0>
- Dong, H., Peng, D., Jiao, X., Zhang, X., Geng, S., & Liu, X. (2011). Roles of the *spiA* gene from *Salmonella enteritidis* in biofilm formation and virulence. *Microbiology*, *157*(6), 1798–1805. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046185-0>
- dos Santos, F. J. B., Lopes, J. A. D., Cito, A. M. G. L., de Oliveira, E. H., De Lima, S. G., & Reis, F. D. A. M. (2004). Composition and biological activity of essential oils from lippia organoides H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*, *16*(5), 504–506. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698782>
- Dou, X., Zhu, X., Wang, J., Dong, N., & Shan, A. (2017). Novel Design of Heptad Amphiphiles

To Enhance Cell Selectivity, Salt Resistance, Antibiofilm Properties and Their Membrane-Disruptive Mechanism. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(6), 2257–2270. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01457>

Edwards-jones, V., Buck, R., Shawcross, S. G., Dawson, M. M., & Dunn, K. (2004). The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns*, 30, 772–777. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2004.06.006>

ENA. (2020). *European Nucleotide Archive*. Sample: SAMEA2665139. <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ERS513150>

Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>

Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevão-Silva, C. F., Carvalho, M. D. D. B., Cunha, J. M., Grespan, R., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. N. (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of *thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/657026>

Foley, S. L., Johnson, T. J., Ricke, S. C., Nayak, R., & Danzeisen, J. (2013). *Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(4), 582–607. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-13>

Fong, J., Mortensen, K. T., Nørskov, A., Qvortrup, K., & Yang, L. (2019). Itaconimides as Novel Quorum Sensing Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00443>

Gallarato, L. A., Sánchez, D. G., Olvera, L., Primo, E. D., Garrido, M. N., Beassoni, P. R., Morett, E., & Lisa, A. T. (2014). ExopolyphTruchado, P., Larrosa, M., Castro-Ibáñez, I., & Allende, A. (2015). Plant food extracts and phytochemicals: Their role as Quorum Sensing Inhibitors. *Trends in Food Science and Technology*, 43(2), 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.02.009>. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(PART 2), 406–417. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074773-0>

García, C. (2006). Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de

Staphylococcus aureus con resistencia multiple. In *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.

Glass, E. M., & Meyer, F. (2011). The Metagenomics RAST Server: A Public Resource for the Automatic Phylogenetic and Functional Analysis of Metagenomes. *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, 8, 325–331. <https://doi.org/10.1002/9781118010518.ch37>

Gonzalez, M. R., Ducret, V., Leoni, S., Fleuchot, B., Jafari, P., Raffoul, W., Applegate, L. A., Que, Y., & Perron, K. (2018). Transcriptome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Cultured in Human Burn Wound Exudates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00039>

Grimm, I., Dumke, J., Dreier, J., Knabbe, C., & Vollmer, T. (2018). Biofilm formation and transcriptome analysis of *Streptococcus gallolyticus* subsp . *gallolyticus* in response to lysozyme. *PONE ONE*, 1–24.

Gwee, C. P., Khoo, C. H., Yeap, S. K., Tan, G. C., & Cheah, Y. K. (2019). Targeted inactivation of *Salmonella Agona* metabolic genes by group II introns and in vivo assessment of pathogenicity and anti-tumour activity in mouse model. *PeerJ*, 2019(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.5989>

Hall, C. W., & Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>

He, X., Zhang, L., Chen, J., Sui, J., Yi, G., Wu, J., & Ma, Y. (2019). Correlation between chemical composition and antifungal activity of *clausena lansium* essential oil against *Candida* spp. *Molecules*, 24(7), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules24071394>

Højby, N., Ciofu, O., & Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*, 5(11), 1663–1674. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.125>

Hood, J. R., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. A. (2003). Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research*, 15(6), 428–433. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9698631>

- Hornik, K. (2013). R Faq. In *Health promotion journal of Australia : official journal of Australian Association of Health Promotion Professionals* (Vol. 24, Issue 3, pp. i-ii). <https://doi.org/10.1071/HEv24n3toc>
- Husain, F. M., Ahmad, I., Al-Thubiani, A. S., Abulreesh, H. H., AlHazza, I. M., & Aqil, F. (2017). Leaf extracts of *Mangifera indica* L. inhibit quorum sensing - Regulated production of virulence factors and biofilm in test bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00727>
- Illumina. (2015). MiSeq System Guide. *Illumina*, 1(September), 17–58. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-system-guide-15027617-01.pdf
- Iñiguez-Moreno, M., Gutiérrez-Lomelí, M., Guerrero-Medina, P. J., & Avila-Novoa, M. G. (2017). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. *Brazilian Journal of Microbiology*, 9, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.002>
- Issa, D., Najjar, A., Greige-Gerges, H., & Nehme, H. (2019). Screening of Some Essential Oil Constituents as Potential Inhibitors of the ATP Synthase of *Escherichia coli*. *Journal of Food Science*, 84(1), 138–146. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14421>
- Jean-Pierre, P., Elodie, G., Dominique de Rocca, S., Sylvain, S., Mathieu, P., Félix, T., Yann, Q., Liliane, B., & Vannina, L. (2018). Anti-Quorum Sensing Activity of 12 Essential Oils on *chromobacterium violaceum* and Specific Action. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23092125>
- Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., Yao, K., & Song, D. (2019). Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2015978>
- Jimenez, P. N., Koch, G., Papaioannou, E., Wahjudi, M., Krzeslak, J., Coenye, T., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2010). Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology*, 156(1), 49–59. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030973-0>

- Johnson, L., Mulcahy, H., Kanevets, U., Shi, Y., & Lewenza, S. (2012). Surface-localized spermidine protects the *Pseudomonas aeruginosa*: Outer membrane from antibiotic treatment and oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, *194*(4), 813–826. <https://doi.org/10.1128/JB.05230-11>
- Jorge, P., Grzywacz, D., Kamysz, W., Lourenço, A., & Pereira, M. O. (2017). Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. *PLoS ONE*, *12*(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174654>
- Kanehisa, M., & Sato, Y. (2020). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*, *29*(1), 28–35. <https://doi.org/10.1002/pro.3711>
- Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. And *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(11), 4057–4061. <https://doi.org/10.1128/AEM.07499-11>
- Khaledi, A., Schniederjans, M., Pohl, S., Rainer, R., Bodenhofer, U., Xia, B., Klawonn, F., Bruchmann, S., Preusse, M., Eckweiler, D., & Dötsch, A. (2016). *Transcriptome Profiling of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa*. *60*(8), 4722–4733. <https://doi.org/10.1128/AAC.00075-16>.Address
- Khan, C. M. A. (2014). The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota, within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. *International Scholarly Research Notices*, *2014*, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2014/846049>
- Knowles, J. R., & Roller, S. (2005). Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *71*(2), 797–803. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.797>
- LaBauve, A. E., & Wargo, Matthew, J. (2015). Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Protocol Microbiology*, *May*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>.Growth
- LABORATORY AMRESKO. (1998). *M63 Medium Broth*. 1998.

- Liao, M., Xiao, J. J., Zhou, L. J., Liu, Y., Wu, X. W., Hua, R. M., Wang, G. R., & Cao, H. Q. (2016). Insecticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and RNA-Seq analysis of *Sitophilus zeamais* transcriptome in response to oil fumigation. *PLoS ONE*, *11*(12), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167748>
- Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E., & Gazim, Z. C. (2016). Quimiotipos, extração, composição e uso do óleo essencial de *Lippia alba*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *18*(1), 191–200. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_037
- Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., Caigueral, S., & Dellacassa, E. (2001). Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. *Flavour and Fragrance Journal*, *16*(5), 356–359. <https://doi.org/10.1002/ffj.1011>
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). *Transcriptomics technologies. Fig 1*, 1–23.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., & Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, *5*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>
- Mackenzie, K. D., Palmer, M. B., Köster, W. L., White, A. P., & White, A. P. (2017). *Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic Salmonella Strains to Colonize Multiple Host Species*. *4*(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00138>
- Macmanes, M. D. (2018). The Oyster River Protocol : a multi-assembler and kmer approach for de novo transcriptome assembly. *BIOINFORMATICS AND GENOMICS*. <https://doi.org/10.7717/peerj.5428>
- Macwilliams, M. P., & Liao, M. (2006). Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol Resource Type : Publication Date : Authors. *American Society for Microbiology*, *October*, *2006*, *7–9*. <https://doi.org/http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3031-luria-broth-lb-and-luria-agar-la-media-and-their-uses-protocol>
- Maestro-Durán, R., León, R., & Ruiz-Gutiérrez, V. (1993). Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. *Grasas y Aceites*, *44*(6), 365–369. <https://doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i6.1070>

- Mahboubi, M., Heidarytabar, R., Mahdizadeh, E., & Hosseini, H. (2017). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus* species and *Zataria multiflora* essential oils. *Agriculture and Natural Resources*, 51(5), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.02.001>
- Mancianti, F., & Ebani, V. V. (2020). Biological activity of essential oils. *Molecules*, 25(3), 2–5. <https://doi.org/10.3390/molecules25030678>
- Marchese, A., Arciola, C. R., Coppo, E., Barbieri, R., Barreca, D., Chebaibi, S., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Daglia, M. (2018). The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling*, 34(6), 630–656. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1480756>
- Martínez Díaz, Y. R. (2010). *Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas como indicativo de la actividad antifouling de compuestos de origen natural* (p. 103). <http://www.bdigital.unal.edu.co/5100/>
- Mcclean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., John, H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., & Williams, P. (1997). *Quorum sensing and Chromobacterium violaceum: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones*.
- Metcalf, D. G., & Bowler, P. G. (2013). *Biofilm delays wound healing: A review of the evidence*. 1(1), 5–12. <https://doi.org/10.4103/2321-3868.113329>
- Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., & Chaieb, K. (2017). Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial Pathogenesis*, 104, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.012>
- Miller, C. L., Van Laar, T. A., Chen, T., Karna, S. L. R., Chen, P., You, T., & Leung, K. P. (2017). Global transcriptome responses including small RNAs during mixed-species interactions with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, 6(3), 1–22. <https://doi.org/10.1002/mbo3.427>
- Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S. H., Hassett, D. J., & Sauer, K. (2006). BdlA, a chemotaxis

- regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(21), 7335–7343. <https://doi.org/10.1128/JB.00599-06>
- Morimoto, Y. V., & Minamino, T. (2014). Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules*, 4(1), 217–234. <https://doi.org/10.3390/biom4010217>
- Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., & Bakri, M. M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>
- Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C. D., Goldberg, J. B., & Bassler, B. L. (2017). The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLoS Pathogens*, 13(7), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006504>
- Musthafa, K. S., Ravi, A. V., Annapoorani, A., Packiavathy, I. S. V., & Pandian, S. K. (2010). Evaluation of anti-quorum-sensing activity of edible plants and fruits through inhibition of the n-acyl-homoserine lactone system in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy*, 56(4), 333–339. <https://doi.org/10.1159/000320185>
- Nagoor Meeran, M. F., Javed, H., Tae, H. Al, Azimullah, S., & Ojha, S. K. (2017). Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: Prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUN), 1–34. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00380>
- Nathwani, D., Raman, G., Sulham, K., Gavaghan, M., & Menon, V. (2014). *Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections : a systematic review and meta-analysis*.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Nikolić, M., Jovanović, K. K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products*, 61, 225–232.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.011>

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47, 3–5. <https://doi.org/10.3791/2437>

Oberhardt, M. A., Goldberg, J. B., Hogardt, M., & Papin, J. A. (2010). Metabolic Network Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* during Chronic Cystic Fibrosis Lung Infection. *Journal of Bacteriology*, 192(20), 5534–5548. <https://doi.org/10.1128/JB.00900-10>

Oberhardt, M. A., Puchałka, J., & Fryer, K. E. (2008). Genome-Scale Metabolic Network Analysis of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2790–2803. <https://doi.org/10.1128/JB.01583-07>

Olasupo, N. A., Fitzgerald, D. J., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 37(6), 448–451. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01427.x>

Omer, E. A., Hendawy, S. F., Ismail, R. F., Petretto, G. L., Rourke, J. P., & Pintore, G. (2017). Acclimatization study of *Tagetes lucida* L. in Egypt and the chemical characterization of its essential oils. *Natural Product Research*, 31(13), 1509–1517. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1278594>

OMS. (2017). OMS | La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. In *Who*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70222-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70222-1)

OMS. (2018a). *Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo*.

OMS. (2018b). *Resistencia a los antimicrobianos*. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>

OMS | ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos? (2015). In *Who*. <http://www.who.int/features/qa/75/es/>

- Orbera, T. (2009). Sobre “Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico.” *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 252. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.06.001>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). Salmonella (no tifoidea). In *Oms* (pp. 1–4). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
- Organizacion Panamericana de la Salud, O. M. de la S. (2015). Plan de Accion sobre la resistencia a los antimicrobianos. *67.a SESIÓN DEL COMITÉ REGIONAL DE LA OMS PARA LAS AMÉRICAS*.
- Ovalle, M. V., Rojas, S. Y., & Rodriguez, M. K. (2017). *Informe de Resultados de la Vigilancia por Laboratorio de Resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) 2017* (pp. 1–31).
- Palu, C. C., Ribeiro-Alves, M., Wu, Y., Lawlor, B., Baranov, P. V., Kelly, B., & Walsh, P. (2019). Simplicity diffexpress: A bespoke cloud-based interface for RNA-seq differential expression modeling and analysis. *Frontiers in Genetics*, 10(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00356>
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., & Jermakow, K. (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1871–1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>
- Pandit, S., Ravikumar, V., Abdel-Haleem, A. M., Derouiche, A., Mokkaleti, V. R. S. S., Sihlbom, C., Mineta, K., Gojobori, T., Gao, X., Westerlund, F., & Mijakovic, I. (2017). Low concentrations of vitamin C reduce the synthesis of extracellular polymers and destabilize bacterial biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02599>
- Papenfors, K., Bassler, B., & Chase, C. (2017). Quorum sensing Signal- Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nat Ev Microbiology*, 14(9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89.Quorum-Sensing>
- Parks, D., & Beiko, R. (2013). STAMP : Statistical Analysis of Metagenomic Profiles Defining Metagenomic Profiles and Sample Metadata. *Encyclopedia of Metagenomics*, 1–6. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6418-1>

Passos, G. (2014). *TRANSCRIPTOMICS IN THE HEALTH AND DISEASE*. Springer.

Patsilinakos, A., Artini, M., Papa, R., Sabatino, M., Božović, M., Garzoli, S., Vrenna, G., Buzzi, R., Manfredini, S., Selan, L., & Ragno, R. (2019). Machine Learning Analyses on Data including Essential Oil Chemical Composition and In Vitro Experimental Antibiofilm Activities against *Staphylococcus* Species. *Molecules*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050890>

Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>

Pletzer, D., Braun, Y., Dubiley, S., Lafon, C., Köhler, T., Page, M. G. P., Mourez, M., Severinov, K., & Weingart, H. (2015). The *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ABC transporter NppA1A2BCD is required for uptake of peptidyl nucleoside antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 197(13), 2217–2228. <https://doi.org/10.1128/JB.00234-15>

Poli, J. P., Guinoiseau, E., De Rocca Serra, D., Sutour, S., Paoli, M., Tomi, F., Quilichini, Y., Berti, L., & Lorenzi, V. (2018). Anti-quorum sensing activity of 12 essential oils on *chromobacterium violaceum* and specific action of cis-cis-p-menthenolide from corsican mentha suaveolens ssp. Insularis. *Molecules*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092125>

Porter, J. A., & Monu, E. A. (2019). Evaluating the antimicrobial efficacy of white mustard essential oil alone and in combination with thymol and carvacrol against *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 82(12), 2038–2043. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-029>

Pribul, B. R., Festivo, M. L., Rodrigues, M. S., Costa, R. G., Rodrigues, E. C. P., Souza, M. M. S. De, & Rodrigues, D. P. (2017). Characteristics of Quinolone Resistance in *Salmonella* spp. Isolates from the Food Chain in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 8(March). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00299>

Qin, N., Tan, X., Jiao, Y., Liu, L., Zhao, W., Yang, S., & Jia, A. (2014). RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Scientific Reports*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep05467>

- Raffa, R. B., Iannuzzo, J. R., Levine, D. R., Saeid, K. K., Schwartz, R. C., Sucic, N. T., Terleckyj, O. D., & Young, J. M. (2005). Bacterial Communication (“ Quorum Sensing ”) via Ligands and Receptors : A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. *Perspectives in Pharmacology*, 312(2), 417–423. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.075150.films>
- Ramírez-mata, A., Fernández-domínguez, I. J., Nuñez-reza, K. J., Xiqui-vázquez, M. L., & Baca, B. E. (2014). *Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias : quorum sensing , di-GMPc y óxido nítrico*. 46(3), 242–255.
- Rao, M., Padyana, S., Km, D., Kumar, S., Bb, N., & Mf, V. (2018). *Antimicrobial Compounds of Plant Origin as Efflux Pump Inhibitors : New Avenues for Controlling Multidrug Resistant Pathogens Journal of Antimicrobial Agents*. 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2472-1212.1000159>
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by pseudomonas aeruginosa: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*, 2015(June). <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- Reitzer, L. (2004). Biosynthesis of Glutamate, Aspartate, Asparagine, L-Alanine, and D-Alanine. *EcoSal Plus*, 1(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.1.3>
- Rho, M., Tang, H., & Ye, Y. (2010). FragGeneScan: Predicting genes in short and error-prone reads. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq747>
- Ringel, M. T., & Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial Cell*, 5(10), 424–437. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.649>
- Ríos, N., Stashenko, E. E., & Duque, J. E. (2017). Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 61(4), 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.08.005>
- Roberts, R., Bala, H., Ibrar, A., Douglas, S., Foster, S. D., & Fauzia, A. (2009). Hospital and Societal Costs of Antimicrobial-Resistant Infections in a Chicago Teaching Hospital: Implications for Antibiotic Stewardship. *CID*. <https://doi.org/10.1086/605630>

- Römling, U., & Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, 272(6), 541–561. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>
- Rossi, E., Falcone, M., & Johansen, H. K. (2018). High-resolution in situ transcriptomics of *Pseudomonas aeruginosa* unveils genotype independent patho-phenotypes in cystic fibrosis lungs. *Nature*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05944-5>
- Rottini, M. M., Amaral, A. C. F., Ferreira, J. L. P., Oliveira, E. S. C., de Andrade Silva, J. R., Taniwaki, N. N., dos Santos, A. R., Almeida-Souza, F., da Silva Freitas de Souza, C., & da Silva Calabrese, K. (2019). *Endlicheria bracteolata* (Meisn.) Essential Oil as a Weapon against *Leishmania amazonensis*: In vitro assay. *Molecules*, 24(14), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules24142525>
- Sagar, S. S., Kumar, R., & Kaistha, S. D. (2016). Biofilm-An Eternalchronicle of Bacteria. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, 37(2), 45. <https://doi.org/10.5958/0974-0147.2016.00010.6>
- Sankar Ganesh, P., & Ravishankar Rai, V. (2018). Attenuation of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(1), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.05.008>
- Sarrazin, S. L. F., Da Silva, L. A., De Assunção, A. P. F., Oliveira, R. B., Calao, V. Y. P., Da Silva, R., Stashenko, E. E., Maia, J. G. S., & Mourão, R. H. V. (2015). Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia organoides kunth*. *Molecules*, 20(2), 1860–1871. <https://doi.org/10.3390/molecules20021860>
- Sarrazin, S. L. F., Da Silva, L. A., Oliveira, R. B., Raposo, J. D. A., Da Silva, J. K. R., Salimena, F. R. G., Maia, J. G. S., & Mourão, R. H. V. (2015). Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia organoides Kunth*. *Lipids in Health and Disease*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0146-7>
- Schluter, J., Schoech, A. P., Foster, K. R., & Mitri, S. (2016). The Evolution of Quorum Sensing as a Mechanism to Infer Kinship. *PLoS Computational Biology*, 12(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004848>

- Sereno, MJ; Ziech, RE; Druziani, JT; Pereira, JG; Bersot, L. (2017). Antimicrobial Susceptibility and Biofilm Production by Salmonella sp. Strains Isolated from Frozen Poultry Carcasses. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19, 103–108.
- Sim, J. X. F., Khazandi, M., Chan, W. Y., Trott, D. J., & Deo, P. (2019). Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 30(6), 524-e159. <https://doi.org/10.1111/vde.12794>
- Skariyachan, S., Sridhar, V. S., Packirisamy, S., Kumargowda, S. T., & Challapilli, S. B. (2018). Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiologica*, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0585-4>
- Som, E., & Bogen, R. A. F. (2004). ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies. *Infection and Immunity*, 72(12), 1–19. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6757>
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2012). Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G. Di, Djukic´, S., Irkovic´, I. C., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *Apmis*, 115(3), 891–899.
- Suryanarayana, H., Bhagwath, A., Devasya, & Punchapady, D. (2013). *Inhibition of quorum sensing in C hromobacterium cumini L . and P imenta dioica L . violaceum by S zygium*. 3(12), 954–959. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60185-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60185-9)
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action : An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2016/3012462>
- Szabó, M. Á., Varga, G. Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., & Molnár, J. (2009).

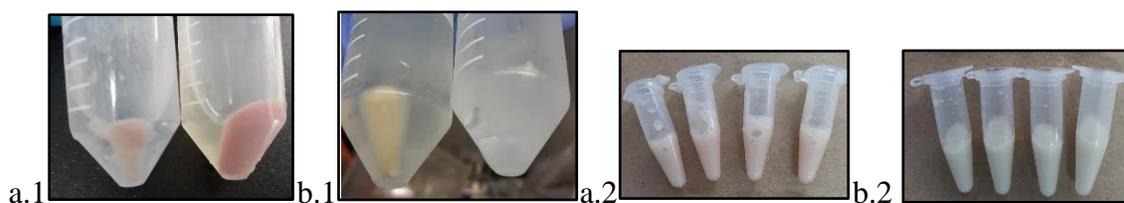
- Inhibition of Quorum-sensing Signals by Essential Oils. *Wiley InterScience*, 22(April 2008), 557–559. <https://doi.org/10.1002/ptr.3010>
- Tanaka, K. J., Song, S., Mason, K., & Pinkett, H. W. (2018). Selective substrate uptake: The role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis. *Biochim Biophys*, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.08.011>.
- Tannières, M., Lang, J., Barnier, C., Shykoff, J. A., & Faure, D. (2017). Quorum-quenching limits quorum-sensing exploitation by signal-negative invaders. *Scientific Reports*, 7(January), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep40126>
- Teneva, D., Denkova, Z., Goranov, B., Denkova, R., Kostov, G., Atanasova, T., & Merdzhanov, P. (2016). *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from black pepper, cumin, coriander and cardamom against Some Pathogenic Microorganisms [2016]*. XX(2). <https://doi.org/10.1515/aucft-2016-0014>
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474–2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>
- Valencia, L. A., Urrego, D. P., & Cifuentes, F. P. (2018). *VIGILANCIA POR LABORATORIO DE Salmonella spp. DIRECCIÓN REDES EN SALUD PÚBLICA. INS* (pp. 1–16).
- van der Walt, A. J., van Goethem, M. W., Ramond, J. B., Makhallanyane, T. P., Reva, O., & Cowan, D. A. (2017). Assembling metagenomes, one community at a time. *BMC Genomics*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3918-9>
- Vignoli, R., & Seija, V. (2000). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Book*, 649–662.
- Vital-Lopez, F. G., Reifman, J., & Wallqvist, A. (2015). Biofilm Formation Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Predicted via Genome-Scale Kinetic Models of Bacterial Metabolism. *PLoS Computational Biology*, 11(10), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004452>
- Wan, C., Shen, Y., Nisar, M. F., Qi, W., Chen, C., & Chen, J. (2019). The antifungal potential of

- Carvacrol against *Penicillium digitatum* through 1H-NMR based metabolomics approach. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/app9112240>
- Wang, L., Jiang, N., Wang, D., & Wang, M. (2019). Effects of essential oil citral on the growth, mycotoxin biosynthesis and transcriptomic profile of *alternaria alternata*. *Toxins*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/toxins11100553>
- Wang, S., Phillippy, A. M., Deng, K., Rui, X., Li, Z., Tortorello, M. Lou, & Zhang, W. (2010). Transcriptomic Responses of *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Typhimurium to Chlorine-Based Oxidative Stress. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 76(15), 5013–5024. <https://doi.org/10.1128/AEM.00823-10>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2019). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>.RNA-Seq
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., & Ca, M. (2007). Look who's talking : communication and quorum sensing in the bacterial world. *THE ROYAL SOCIETY PUBLISHING, March*, 1119–1134. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2039>
- Wu, H. J., Wang, A. H. J., & Jennings, M. P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.023>
- Yang, C., Hu, D. H., & Feng, Y. (2015). Essential oil of *Artemisia vestita* exhibits potent in vitro and in vivo antibacterial activity: Investigation of the effect of oil on biofilm formation, leakage of potassium ions and survival curve measurement. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5762–5770. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4210>
- Yaron, S., & Römling, U. (2014). Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology*, 7(6), 496–516. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12186>
- Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., & Taib, K. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing Origin of antibiotic resistance. 9(6). <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>

Zhao, X., Liu, Z., Liu, Z., Meng, R., Shi, C., Chen, X., Bu, X., & Guo, N. (2018). Microbial Pathogenesis Phenotype and RNA-seq-Based transcriptome profiling of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to tea tree oil. *Microbial Pathogenesis*, 123(March), 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.027>

Apéndices

Apéndice A. Biomasa de células en estado planctónico y de biofilm de (a) *P. aeruginosa* y (b) *S. Enteritidis* para el proceso de extracción de ARN.



Nota. Fotografías posteriores al proceso de raspado de cupónes y centrifugación de biomasa en estado de *biofilm*

Apéndice B. Genes expresados diferencialmente en respuesta al tratamiento con *LO* quimiotipo Timol-Carvacrol II sobre del biofilm de *P. aeruginosa*.

Ruta Metabólica (KO)	GEN	Expresión del Gen	Valor de P
00250 Metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato [PATH:ko00250]	<i>asnB</i> , <i>ASNS</i> ; asparagina sintasa (glutaminahidrolisina) [EC:6.3.5.4]	Negativa	0.0307
	E1.4.1.3; glutamato deshidrogenasa (NAD(P)) [EC:1.4.1.3]	Negativa	0.0391
	<i>E3.5.1.1</i> , <i>ansA</i> , <i>ansB</i> ; L-asparaginasa [EC:3.5.1.1]	Positiva	0.0421
	<i>E6.3.4.5</i> , <i>argG</i> ; argininosuccinato sintasa[EC:6.3.4.5]	Negativa	0.0460

Ruta Metabólica (KO)	GEN	Expresión del Gen	Valor de P
00260 Metabolismo de glicina, serina y trionina [PATH:ko00260]	<i>dsdA</i> ; D-serina deshidratasa [EC:4.3.1.18]	Negativa	0.0245
	<i>soxA</i> ; sarcosina oxidasa, subunidad alfa [EC:1.5.3.1]	Negativa	0.0487
00330 Metabolismo de arginina y prolina [PATH:ko00330]	<i>puuB</i> , <i>ordL</i> ; gamma-glutamyl putrescina oxidasa [EC:1.4.3.-]	Positiva	0.0293
00340 Metabolismo de histidina [PATH:ko00340]	E3.5.2.7, <i>hutI</i> ; imidazolonepropionasa [EC:3.5.2.7]	Negativa	0.0362
00350 Metabolismo de tirosina [PATH:ko00350]	<i>viaY</i> ; alcohol deshidrogenasa [EC:1.1.1.1]	Negativa	0.0210
00380 Metabolismo de triptofano [PATH:ko00380]	E1.13.12.3; triptofano 2-monooxigenasa [EC:1.13.12.3]	Negativa	0.0244
00400 Biosíntesis Fenilalanina, tirosina y triptofano [PATH:ko00400]	<i>aroA</i> ; 3-phosphoshikimate 1-carboxiviniltransferasa [EC:2.5.1.19]	Negativa	0.0243
	<i>pfkA</i> , <i>PFK</i> ; 6-fosfofructoquinasa 1 [EC:2.7.1.11]	Negativa	0.0290
00010 Glicolisis / Gluconeogenesis [PATH:ko00010]	<i>aceE</i> ; piruvato deshidrogenasa E1 component [EC:1.2.4.1]	Negativa	0.0312
	<i>E1.2.1.9</i> , <i>gapN</i> ; gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (NADP) [EC:1.2.1.9]	Negativa	0.0465
00030 Via Pentosa fosfato [PATH:ko00030]	<i>rpiA</i> ; ribosa 5-fosfato isomerasa A [EC:5.3.1.6]	Positiva	0.0012
	<i>rbsK</i> , <i>RBKS</i> ; riboquinasa [EC:2.7.1.15]	Positiva	0.0087
00051 Metabolismo Fructosa y manosa [PATH:ko00051]	<i>manC</i> , <i>cpsB</i> ; manosa-1-fosfato guaniltransferasa [EC:2.7.7.13]	Negativa	0.0128
00500 Metabolismo de almidón y sucrosa [PATH:ko00500]	<i>treS</i> ; maltosa alfa-D-glucosiltransferasa/ alfa-amilasa [EC:5.4.99.16 3.2.1.1]	Negativa	0.0001
	E2.4.1.21, <i>glgA</i> ; almidón sintetasa [EC:2.4.1.21]	Negativa	0.0033
	<i>glgB</i> ; 1,4-alfa-glucano enzima de ramificación [EC:2.4.1.18]	Negativa	0.0297

Ruta Metabólica (KO)	GEN	Expresión del Gen	Valor de P
00520 Metabolismo de azúcares amino y nucleótidos [PATH:ko00520]	<i>arnC</i> , <i>pmrF</i> ; undecaprenil-fosfato 4-desoxi-4-formamido-L-arabinosa transferasa [EC:2.7.8.30]	Negativa	0.0075
00640 Metabolismo Propanoato [PATH:ko00640]	<i>E2.7.2.15</i> , <i>tdcD</i> , <i>pduW</i> ; propionato quinasa [EC:2.7.2.15]	Positiva	0.0195
04122 Sistema de transferencia de hierro [PATH:ko04122]	<i>MOCS3</i> , <i>UBA4</i> , <i>moeB</i> ; adenililtransferasa y sulfurotransferasa	Positiva	0.0078
00561 Metabolismo Glicerolipidos [PATH:ko00561]	<i>pduC</i> ; propanediol deshidratasa subunidad larga [EC:4.2.1.28]	Positiva	0.0355
	<i>E2.7.1.30</i> , <i>glpK</i> ; glicerol quinase [EC:2.7.1.30]	Negativa	0.0479
	<i>cls</i> ; cardiolipina sintetasa [EC:2.7.8.-]	Positiva	0.0263
00591 Metabolismo ácido Linoleico [PATH:ko00591]	<i>E1.14.19.3</i> ; linoleoil-CoA desaturasa [EC:1.14.19.3]	Negativa	0.0317
	<i>modB</i> ; molibdato sistema de transporte de proteína permeasa	Negativa	0.0035
	<i>gsiA</i> ; Sistema de transporte de glutation ATP-proteína de unión	Positiva	0.0099
02010 Transportadores ABC [PATH:ko02010]	<i>hisJ</i> ; histidina Sistema transportador de proteína de unión al sustrato	Positiva	0.0174
	<i>potI</i> ; putrescina Sistema de transporte de proteína permeasa	Negativa	0.0229
	<i>pstS</i> ; fosfato Sistema transportador de proteína de unión al sustrato	Negativa	0.0269
	<i>yddA</i> ; putativo ATP-binding cassette transporter	Negativa	0.0401
02060 Sistema fosfotransferasa (PTS) [PATH:ko02060]	<i>PTS-Scr-EIIC</i> , <i>scrA</i> ; PTS sistema, sucrosa-específica componente IIC		0.0355
03070 Sistema de secreción bacteriano [PATH:ko03070]	<i>tatE</i> ; sec-proteína independiente de translocación, proteína TatE	Positiva	0.0078
	<i>secB</i> ; preproteína de translocación subunidad SecB	Negativa	0.0285

Ruta Metabólica (KO)		GEN	Expresión del Gen	Valor de P
00130 Biosíntesis de Ubiquinona y otros terpenoides-quinona [PATH:ko00130]		<i>menA</i> ; 1,4-dihidroxi-2-naftolato octapreniltransferasa [EC:2.5.1.74 2.5.1.-]	Positiva	0.0380
		<i>ubiE</i> ; ubiquinona/menaquinona biosíntesis metiltransferasa [EC:2.1.1.163 2.1.1.201]	Positiva	0.0380
00740 Metabolismo Riboflavina [PATH:ko00740]		<i>ribD</i> ; diamino-hidroxifosforibosilaminopirimidina deaminasa/ 5-amino-6-(5-fosforibosilamino)uracil reductasa [EC:3.5.4.26 1.1.1.193]	Positiva	0.0236
00760 Metabolismo Nicotinato y nicotinamida [PATH:ko00760]		<i>pncB</i> , <i>NAPRTI</i> ; nicotinate fosforibosiltransferasa [EC:2.4.2.11]	Positiva	0.0057
00770 Biosíntesis Pantotenato y CoA [PATH:ko00770]		<i>acpS</i> ; holo-[acyl-proteína transportadora] sintetasa [EC:2.7.8.7]	Positiva	0.0078
		<i>acpH</i> ; acil proteína transportadora fosfodiesterasa [EC:3.1.4.14]	Positiva	0.0355
00281 Degradación Geraniol [PATH:ko00281]		E1.3.99.-; [EC:1.3.99.-]	Negativa	0.0041
00900 Biosíntesis de esqueleto de terpenoides [PATH:ko00900]		<i>idi</i> , <i>IDI</i> ; isopentenil-difosfato delta-isomerasa [EC:5.3.3.2]	Positiva	0.0355
00230 Metabolismo Purinas [PATH:ko00230]		<i>ppx-gppA</i> ; exopolifosfatasa / guanosin-5'-trifosfato,3'-difosfato pirofosfatasa [EC:3.6.1.11 3.6.1.40]	Positiva	0.0099
		<i>E2.7.4.8</i> , <i>gmk</i> ; guanilato quinasa [EC:2.7.4.8]	Positiva	0.0355
00240 Metabolismo pirimidinas [PATH:ko00240]		<i>upp</i> , <i>UPRT</i> ; uracil fosforibosiltransferasa [EC:2.4.2.9]	Positiva	0.0078
03420 Reparación de escisión de nucleótidos [PATH:ko03420]		<i>uvrB</i> ; excinucleasa AB subunidad B	Negativa	0.0418
02020 Sistema de dos componentes [PATH:ko02020]		<i>narQ</i> ; Sistema de dos componentes, familia <i>NarL</i> , nitrato/nitrito sensor histidina quinasa <i>NarQ</i> [EC:2.7.13.3]	Positiva	0.0355
		<i>frdC</i> ; fumarato reductasa subunidad C	Positiva	0.0355

Ruta Metabólica (KO)	GEN	Expresión del Gen	Valor de P
04011 Vía de señalización MAPK - levadura [PATH:ko04011]	<i>E4.4.1.5, GLO1, gloA</i> ; lactoilglutacion liasa [EC:4.4.1.5]	Negativa	0.0139
03020 RNA polimerasa [PATH:ko03020]	<i>SIG3.2, rpoE</i> ; RNA polimerasa sigma-70 factor, ECF subfamilia	Positiva	0.0385
00970 Biosíntesis Aminoacyl-tRNA [PATH:ko00970]	<i>RARS, argS</i> ; arginil-tRNA sintetasa [EC:6.1.1.19]	Positiva	0.0059
	<i>LARS, leuS</i> ; leucil-tRNA sintetasa [EC:6.1.1.4]	Positiva	0.0156
03010 Ribosoma [PATH:ko03010]	<i>RP-S6, rpsF</i> ; subunidad pequeña proteína ribosomal S6	Negativa	0.0312
00791 Degradación Atrazina [PATH:ko00791]	<i>atzB</i> ; hidroxiatrazina etilaminohidrolasa [EC:3.5.99.3]	Negativa	0.0467

Nota. Principales genes expresados tomando como base la ortología KEGG

Apéndice C. Genes expresados diferencialmente en respuesta al tratamiento con LO quimiotipo Timol-Carvacrol II sobre del biofilm de *S. Enteritidis*.

Ruta Metabólica (RUTA KO)	GEN	Expresión del GEN	Valor de P
00010 Glicolisis / Gluconeogenesis [PATH:ko00010]	<i>E4.1.1.49, pckA</i> ; fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP) [EC:4.1.1.49]	Negativa	0.0366
00020 Ciclo del citrato (TCA cycle) [PATH:ko00020]	<i>acnB</i> ; aconitato hidratasa 2 / 2- metilisocitrato deshidratasa [EC:4.2.1.3 4.2.1.99]	Negativa	0.0105
	<i>sdhC</i> ; succinato dehidrogenasa citocromo b556 subunidad	Negativa	0.0410
00030 Via de la pentosa fosfato[PATH:ko00030]	<i>gdh</i> ; glucosa 1-dehidrogenasa [EC:1.1.1.47]	Negativa	0.0357
00040 Interconversiones pentosa y glucoronato [PATH:ko00040]	<i>araA</i> ; L-arabinosa isomerasa [EC:5.3.1.4]	Positiva	0.0201
00051 Metabolismo de fructosa y manosa [PATH:ko00051]	E1.1.1.271, <i>fcl</i> ; GDP-L-fucosa sintasa [EC:1.1.1.271]	Positiva	0.0206
00053 Metabolismo de ascorbato y aldarato [PATH:ko00053]	<i>ulaG</i> ; L-ascorbato 6-fosfato lactonasa [EC:3.1.1.-]	Positiva	0.0049
00061 Biosíntesis de ácidos grasos [PATH:ko00061]	<i>fabB</i> ; 3-oxoacil-[proteína transportador de acilo] sintase I [EC:2.3.1.41]	Negativa	0.0026
	<i>fabF</i> ; 3-oxoacil-[proteína transportador de acilo] sintase II [EC:2.3.1.179]	Negativa	0.0115
00071 Biosíntesis de ácidos grasos [PATH:ko00071]	<i>fadE</i> ; acil-CoA deshidrogenasa [EC:1.3.99.-]	Negativa	0.0077
00140 Biosíntesis hormonas esteroideas[PATH:ko001 40]	E3.1.6.1, <i>aslA</i> ; arilsulfatasa [EC:3.1.6.1]	Positiva	0.0007

Ruta Metabólica (RUTA KO)	GEN	Expresión del GEN	Valor de P
00190 Fosforilación oxidativa [PATH:ko00190]	<i>cyoC</i> ; citocromo o ubiquinol oxidasa subunidad III [EC:1.10.3.-]	Negativa	0.0236
	<i>cyoB</i> ; cytochrome o ubiquinol oxidasa subunidad I [EC:1.10.3.-]	Negativa	0.0249
	<i>nuoA</i> ; NADH-quinona oxidoreductasa subunidad A [EC:1.6.5.3]	Positiva	0.0322
00230 Metabolismo de purinas [PATH:ko00230]	<i>allA</i> ; ureidoglicolato hidrolasa [EC:3.5.3.19]	Positiva	0.0407
00250 Metabolismo de Alanina, aspartato y glutamato [PATH:ko00250]	<i>gudB, rocG</i> ; glutamato deshidrogenasa [EC:1.4.1.2]	Negativa	0.0102
	<i>aspA</i> ; aspartato ammonio-liasa [EC:4.3.1.1]	Positiva	0.0405
	<i>betB, gbsA</i> ; betaina-aldehido deshidrogenasa [EC:1.2.1.8]	Negativa	0.0315
00260 Metabolismo de Glicina, serina y treonina [PATH:ko00260]	<i>E4.3.1.19, ilvA, tdcB</i> ; treonina deshidratasa [EC:4.3.1.19]	Positiva	0.0416
	<i>trpA</i> ; triptofano sintasa cadena alfa [EC:4.2.1.20]	Negativa	0.0455
	<i>metZ</i> ; O-succinilhomoserin sulfhidrolasa [EC:2.5.1.-]	Negativa	0.0051
00270 Metabolismo de cisteína y metionina [PATH:ko00270]	<i>E4.4.1.11</i> ; metionina-gamma-liasa [EC:4.4.1.11]	Negativa	0.0054
	<i>patB, maly</i> ; cistation beta-liasa [EC:4.4.1.8]	Positiva	0.0188
	<i>E2.1.1.13, meth</i> ; 5-metiltetrahidrofolato--homocistein metiltransferasa [EC:2.1.1.13]	Negativa	0.0341
	<i>cysK</i> ; cisteina sintasa A [EC:2.5.1.47]	Negativa	0.0495
	<i>E2.3.1.16, fadA</i> ; acetil-CoA aciltransferasa [EC:2.3.1.16]	Negativa	0.0121
00280 Degradación de valina, leucina e isoleucina [PATH:ko00280]	<i>E6.4.1.4B</i> ; 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa subunidad beta [EC:6.4.1.4]	Negativa	0.0304
	<i>liuC</i> ; metilglutaconil-CoA hidratasa [EC:4.2.1.18]	Negativa	0.0326
	<i>E1.2.1.3</i> ; aldehido deshidrogenasa (NAD+) [EC:1.2.1.3]	Positiva	0.0432

Ruta Metabólica (RUTA KO)	GEN	Expresión del GEN	Valor de P
00281 Degradación de geraniol [PATH:ko00281]	<i>atuE</i> ; isohexenilglutaconil-CoA hidratasa [EC:4.2.1.57]	Negativa	0.0256
00300 Biosíntesis de lisina [PATH:ko00300]	<i>LYSI</i> ; sacaropina deshidrogenasa (NAD ⁺ , formación L-lisina) [EC:1.5.1.7]	Negativa	0.0256
	<i>dapF</i> ; diaminopimelato epimerasa [EC:5.1.1.7]	Negativa	0.0410
	<i>dapC</i> ; N-succinildiaminopimelato aminotransferasa [EC:2.6.1.17]	Negativa	0.0484
	<i>OGDH</i> , <i>sucA</i> ; 2-oxoglutarato deshidrogenasa componente E1 [EC:1.2.4.2]	Negativa	0.0252
	<i>DLST</i> , <i>sucB</i> ; 2-oxoglutarato deshidrogenasa componente E2 (dihidrolipoamida succiniltransferasa) [EC:2.3.1.61]	Negativa	0.0286
00330 Metabolismo de arginina y prolina [PATH:ko00330]	<i>eda</i> ; 2-dehidro-3-deoxifosfogluconato aldolasa / 4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolasa [EC:4.1.2.14 4.1.3.16]	Positiva	0.0131
	<i>astA</i> ; arginina N-succiniltransferasa [EC:2.3.1.109]	Negativa	0.0056
00340 Metabolismo de histidina [PATH:ko00340]	E5.3.1.16, <i>hisA</i> ; fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotida isomerasa [EC:5.3.1.16]	Negativa	0.0406
	<i>E3.5.3.13</i> ; formimidoilglutamato deiminasa [EC:3.5.3.13]	Positiva	0.0443
00350 Metabolismo de tirosina [PATH:ko00350]	<i>adhP</i> ; alcohol deshidrogenasa, propanol- <i>preferring</i> [EC:1.1.1.1]	Positiva	0.0476
00360 Metabolismo de fenilalanina [PATH:ko00360]	<i>feaB</i> ; fenilacetaldehído deshidrogenasa [EC:1.2.1.39]	Positiva	0.0242
00363 Degradación de bisfenol [PATH:ko00363]	E1.13.11.41; 2,4'-dihidroxiacetofenona dioxigenasa [EC:1.13.11.41]	Negativa	0.0256
00380 Metabolismo del triptofano [PATH:ko00380]	E1.13.12.3; triptofano 2-monooxigenasa [EC:1.13.12.3]	Negativa	0.0383
00400 Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y	E1.3.1.12; pefenato deshidrogenasa [EC:1.3.1.12]	Negativa	0.0126

Ruta Metabólica (RUTA KO)	GEN	Expresión del GEN	Valor de P
triptofano [PATH:ko00400]	<i>aroA</i> ; 3-fosfoshikimato 1- carboxiviniltransferasa [EC:2.5.1.19]	Negativa	0.0384
	<i>aroD</i> ; 3-dehidroquinato deshidratasa I [EC:4.2.1.10]	Positiva	0.0419
	<i>aroQ</i> , <i>qutE</i> ; 3-dehidroquinato deshidratase II [EC:4.2.1.10]	Negativa	0.0469
00480 Metabolismo del glutation [PATH:ko00480]	<i>pepN</i> ; aminopeptidasa N [EC:3.4.11.2]	Negativa	0.0085
00500 Metabolismo de almidón y sacarosa [PATH:ko00500]	<i>treS</i> ; maltosa alpha-D-glucosiltransferasa/ alfa-amilasa [EC:5.4.99.16 3.2.1.1]	Negativa	0.0266
00520 Metabolismo de azúcares amino y nucleótidos [PATH:ko00520]	<i>murA</i> ; UDP-N-acetilglucosamina 1- carboxiviniltransferasa [EC:2.5.1.7]	Negativa	0.0194
00540 Biosíntesis de lipopolisacaridos [PATH:ko00540]	<i>gmhB</i> ; D-glicerol-D-manno-heptosa 1,7- bifosfato fosfatasa [EC:3.1.3.82 3.1.3.83]	Negativa	0.0015
	<i>waaF</i> , <i>rfaF</i> ; heptosiltransferasa II [EC:2.4.-.-]	Positiva	0.0249
	<i>waaJ</i> , <i>rfaJ</i> ; UDP-glucosa:(galactosil)LPS alfa-1,2-glucosiltransferasa [EC:2.4.1.58]	Positiva	0.0316
00550 Biosíntesis de peptidoglicano [PATH:ko00550]	<i>ddl</i> ; D-alanina-D-alanina ligasa [EC:6.3.2.4]	Negativa	0.0230
	<i>mraY</i> ; fosfo-N-acetilmuramoil- pentapeptido-transferasa [EC:2.7.8.13]	Negativa	0.0495
	<i>pduP</i> ; propionaldehido deshidrogenasa	Positiva	0.0115
	<i>pduC</i> ; propanediol deshidratasa subunidad larga [EC:4.2.1.28]	Positiva	0.0150
	<i>pduQ</i> ; 1-propanol deshidrogenasa	Positiva	0.0302
00561 Metabolismo de glicerolipidos [PATH:ko00561]	<i>plsB</i> ; glicerol-3-fosfato O-aciltransferasa [EC:2.3.1.15]	Negativa	0.0397
	<i>pduE</i> ; propanediol deshidratasa subunidad pequeña [EC:4.2.1.28]	Positiva	0.0407
	<i>pldB</i> ; lisofosfolipasa [EC:3.1.1.5]	Positiva	0.0258
	<i>eutA</i> ; etanolamina proteína utilización EutA	Positiva	0.0392

Ruta Metabólica (RUTA KO)	GEN	Expresión del GEN	Valor de P
00562 Metabolismo del fosfato de inositol [PATH:ko00562]	<i>iolC</i> ; 5-deshidro-2-deoxigluconoquinasa [EC:2.7.1.92]	Negativa	0.0086
00620 Metabolismo de piruvato [PATH:ko00620]	<i>fucO</i> ; lactaldehido reductasa [EC:1.1.1.77]	Positiva	0.0070
	<i>accD</i> ; acetil-CoA carboxilasa carboxil transferasa subunidad beta [EC:6.4.1.2]	Negativa	0.0213
	<i>eutD</i> ; fosfotransacetilasa	Positiva	0.0345
00630 Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato [PATH:ko00630]	<i>E5.3.1.22, gip</i> ; hidroxipiruvato isomerasa [EC:5.3.1.22]	Positiva	0.0103
	<i>purU</i> ; formiltetrahidrofolato deformilasa [EC:3.5.1.10]	Positiva	0.0220
00640 Metabolismo del propanoato [PATH:ko00640]	<i>E2.7.2.15, tdcD, pduW</i> ; propionato quinasa [EC:2.7.2.15]	Positiva	0.0083
	<i>E3.5.99.7</i> ; 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa [EC:3.5.99.7]	Positiva	0.0254
00650 Metabolismo de butanoato [PATH:ko00650]	<i>phbC, phaC</i> ; polihidroxicanoato sintasa [EC:2.3.1.-]	Negativa	0.0092
00740 Metabolismo de Riboflavina [PATH:ko00740]	<i>ribF</i> ; riboflavina quinasa / FMN adenililtransferasa [EC:2.7.1.26 2.7.7.2]	Negativa	0.0357
00760 Metabolismo de nicotina y nicotinamida [PATH:ko00760]	<i>yjjG</i> ; 5'-nucleotidasa [EC:3.1.3.5]	Positiva	0.0419
	<i>nadE</i> ; NAD ⁺ sintasa [EC:6.3.1.5]	Negativa	0.0145
	<i>hemB, ALAD</i> ; porfoobilinogeno sintasa [EC:4.2.1.24]	Negativa	0.0005
00860 Metabolismo de porfirina y clorofila [PATH:ko00860]	<i>eutT</i> ; etanolamina utilización cobalamina adenosiltransferasa [EC:2.5.1.17]	Positiva	0.0061
	<i>cbiD</i> ; cobalto-precorrín-5B (C1)-metiltransferasa [EC:2.1.1.195]	Positiva	0.0077
	<i>hemA</i> ; glutamil-tRNA reductasa [EC:1.2.1.70]	Negativa	0.0384
00900 Metabolismo del esqueleto del terpenoide [PATH:ko00900]	<i>ispF</i> ; 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa [EC:4.6.1.12]	Negativa	0.0054
	<i>norB</i> ; oxido nitrico reductasa subunidad B [EC:1.7.2.5]	Negativa	0.0054

Ruta Metabólica (RUTA KO)	GEN	Expresión del GEN	Valor de P
00910 Metabolismo de Nitrogeno [PATH:ko00910]	<i>nrfC</i> ; proteína NrfC	Positiva	0.0392
	<i>narZ</i> ; nitrato reductasa 2, subunidad alfa [EC:1.7.99.4]	Positiva	0.0407
	<i>norC</i> ; nitrato reductasa, citocromo c- conteniendo subunidad II [EC:1.7.99.7]	Negativa	0.0167
	<i>napD</i> ; periplasmico nitrato reductasa NapD	Positiva	0.0392
	<i>nrfF</i> ; formato-dependiente nitrito reductasa complejo NrfF subunidad	Positiva	0.0461
00920 Metabolismo del azufre [PATH:ko00920]	<i>cysNC</i> ; enzima bifuncional CysN/CysC [EC:2.7.7.4 2.7.1.25]	Negativa	0.0274
00970 Biosíntesis de aminoacil-ARNt [PATH:ko00970]	<i>QARS</i> , <i>glnS</i> ; glutaminil-tRNA sintetasa [EC:6.1.1.18]	Negativa	0.0107
	<i>RARS</i> , <i>argS</i> ; arginil-tRNA sintetasa [EC:6.1.1.19]	Negativa	0.0219
	<i>yejF</i> ; sistema de transporte microcina C proteína de union ATP-	Negativa	0.0083
	<i>fliY</i> ; cistina sistema de transporte proteína de unión a sustrato	Negativa	0.0130
	<i>aapP</i> , <i>bztD</i> ; Proteína de unión a ATP. Sistema general de transporte de L- aminoácidos general [EC:3.6.3.-]	Negativa	0.0189
	<i>aapP</i> , <i>bztD</i> ; Proteína de unión a ATP. Sistema general de transporte de L- aminoácidos [EC:3.6.3.-]	Negativa	0.0204
02010 Transportadores ABC [PATH:ko02010]	<i>livG</i> ; Sistema de transporte de amino ácidos en cadena ramificados b sistema, proteína de unión a ATP	Negativa	0.0224
	<i>yejA</i> ; Sistema de transporte microcina C proteína de union a sustrato	Negativa	0.0236
	<i>pstB</i> ; Sistema de transporte de fosfato - proteína de union a ATP [EC:3.6.3.27]	Positiva	0.0269
	<i>araF</i> ; Sistema de transporte de L-arabinosa proteína de union a sustrato	Negativa	0.0332
	<i>araH</i> ; Sistema de transporte L-arabinose Sistema de proteína permeasa	Negativa	0.0357
	<i>ABC-2.AB.P</i> ; Sistema de transporte de antibióticos proteína permeasa	Positiva	0.0381

Ruta Metabólica (RUTA KO)	GEN	Expresión del GEN	Valor de P
02020 Sistema de dos componentes [PATH:ko02020]	<i>thiP</i> ; Sistema de transporte de tiamina proteína permeasa	Positiva	0.0392
	<i>ugpA</i> ; Sistema de transporte sn-glicerol 3- fosfato proteína permeasa	Positiva	0.0419
	<i>msbA</i> ; ATP-binding cassette, subfamilia B, bacteria MsbA [EC:3.6.3.-]	Negativa	0.0448
	<i>aapQ</i> , <i>bztB</i> ; Sistema de transporte general L-amino ácidos proteína permeasa	Negativa	0.0459
	<i>ttrA</i> ; tetrionato reductasa subunidad A	Positiva	0.0009
	<i>kdpA</i> ; K ⁺ -transporte ATPasa A [EC:3.6.3.12]	Negativa	0.0015
	<i>pilJ</i> ; twitching motility protein PilJ	Negativa	0.0049
	<i>fdnI</i> ; formato dehidrogenasa-N, subunidad gamma	Positiva	0.0054
	<i>pgtC</i> ; transporte de fosfoglicerato proteína reguladora PgtC	Positiva	0.0054
	<i>flrA</i> ; sigma-54 regulador transcripcional específico flagellar proteína reguladora A	Negativa	0.0102
	<i>dpiB</i> , <i>citA</i> ; Sistema de dos componentes, CitB familia, cit operon sensor histidin quinasa CitA [EC:2.7.13.3]	Positiva	0.0151
	<i>evgS</i> , <i>bvgS</i> ; Sistema de dos componentes, NarL familia, sensor histidin quinasa EvgS [EC:2.7.13.3]	Negativa	0.0151
	<i>ttrC</i> ; tetrionato reductasa subunidad C	Positiva	0.0176
	<i>citX</i> ; holo-ACP sintasa [EC:2.7.7.61]	Positiva	0.0206
	<i>ttrB</i> ; tetrionato reductasa subunidad B	Positiva	0.0212
	<i>arnB</i> , <i>pmrH</i> ; UDP-4-amino-4-deoxi-L- arabinosa-oxoglutarato aminotransferasa [EC:2.6.1.87]	Positiva	0.0224
	<i>dpiA</i> , <i>citB</i> ; Sistema de dos componentes, CitB familia, regulador de respuesta CitB	Positiva	0.0292
<i>dctB</i> ; Sistema de dos componentes, NtrC familia, C4-dicarboxilato transportador sensor histidin quinasa DctB [EC:2.7.13.3]	Negativa	0.0321	
<i>frdA</i> ; fumarato reductasa subunidad flavoproteína [EC:1.3.99.1]	Positiva	0.0325	

Ruta Metabólica (RUTA KO)		GEN	Expresión del GEN	Valor de P
		<i>ttrR</i> ; Sistema de dos componentes, LuxR familia, regulador de respuesta TtrR	Positiva	0.0392
		<i>kdpD</i> ; Sistema de dos componentes, OmpR familia, sensor histidin quinasa KdpD [EC:2.7.13.3]	Negativa	0.0406
02030	Quimiotaxis bacteriana [PATH:ko02030]	<i>trg</i> ; methyl-accepting proteína de quimiotaxis III, ribosa y galactosa sensor receptor	Positiva	0.0366
		<i>motB</i> ; proteína de quimiotaxis MotB	Positiva	0.0367
02040	Ensamblaje flagelar [PATH:ko02040]	<i>flgE</i> ; proteína de gancho flagelar FlgE	Positiva	0.0315
		<i>fliI</i> ; ATP sintasa específica de flagelo [EC:3.6.3.14]	Positiva	0.0343
		<i>PTS-Scr-EIIC</i> , <i>scrA</i> ; Sistema PTS sucrosa-specific IIC componente	Positiva	0.0130
02060	Sistema de fosfotransferasa (PTS) [PATH:ko02060]	<i>PTS-Scr-EIIB</i> , <i>scrA</i> ; sistema PTS, sucrosa-especifico IIB componente IIC [EC:2.7.1.69]	Positiva	0.0130
		<i>PTS-Gat-EIIC</i> , <i>gatC</i> ; sistema PTS, galactitol-específico componente IIC	Positiva	0.0144
		<i>RP-L5</i> , <i>rplE</i> ; subunidad larga proteína ribosomal L5	Negativa	0.0013
		<i>RP-S5</i> , <i>rpsE</i> ; subunidad pequeña proteína ribosomal S5	Negativa	0.0027
03010	Ribosoma [PATH:ko03010]	<i>RP-L20</i> , <i>rplT</i> ; subunidad larga proteína ribosomal L20	Negativa	0.0107
		<i>RP-L18</i> , <i>rplR</i> ; subunidad larga proteína ribosomal L18	Negativa	0.0137
		<i>RP-S4</i> , <i>rpsD</i> ; subunidad pequeña proteína ribosomal S4	Negativa	0.0400
		<i>RP-S2</i> , <i>rpsB</i> ; subunidad pequeña proteína ribosomal S2	Negativa	0.0488
03020	ARN polymerasa [PATH:ko03020]	<i>rpoBC</i> ; DNA-directed RNA polimerasa subunidad beta-beta' [EC:2.7.7.6]	Negativa	0.0264
		<i>rpoB</i> ; DNA-directed RNA polimerasa subunidad beta [EC:2.7.7.6]	Negativa	0.0291
03030	ADN replicación [PATH:ko03030]	<i>DPO3G</i> , <i>dnaX</i> ; DNA polimerasa III subunidad gamma/tau [EC:2.7.7.7]	Negativa	0.0202

Ruta Metabólica (RUTA KO)	GEN	Expresión del GEN	Valor de P
03070 Sistema de secreción bacteriano [PATH:ko03070]	<i>DPO3C</i> , <i>holC</i> ; DNA polimerasa III subunidad chi [EC:2.7.7.7]	Negativa	0.0326
	<i>virB3</i> , <i>lvhB3</i> ; sistema de secreción tipo IV proteína VirB3	Negativa	0.0035
	<i>yscS</i> ; Sistema de secreción tipo III proteína SctS	Negativa	0.0054
	<i>vasG</i> , <i>clpV</i> ; Sistema de secreción tipo VI proteína VasG	Negativa	0.0296
03410 Reparación de escisión de base [PATH:ko03410]	<i>alkA</i> ; DNA-3-metiladeninsa glicosilasa II [EC:3.2.2.21]	Positiva	0.0476
03440 Recombinación homóloga [PATH:ko03440]	<i>priC</i> proteína de replicación primosomal	Positiva	0.0226
04070 Sistema de señalización de fosfatidilinositol [PATH:ko04070]	<i>E2.7.7.41</i> , <i>CDS1</i> , <i>CDS2</i> , <i>cdsA</i> ; fosfatidato citidililtransferasa [EC:2.7.7.41]	Negativa	0.0419
04112 Ciclo celular - Caulobacter [PATH:ko04112]	<i>rseP</i> ; regulador de sigma E proteasa [EC:3.4.24.-]	Negativa	0.0216
	<i>flp</i> , <i>pilA</i> ; proteína de ensamblaje de pili Flp/PilA	Positiva	0.0325
04122 Sistema de transferencia de azufre [PATH:ko04122]	<i>tusD</i> , <i>dsrE</i> ; tRNA 2-tiouridina síntesis proteína D [EC:2.8.1.-]	Negativa	0.0054
04146 Peroxisom}a [PATH:ko04146]	<i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>icd</i> ; isocitrato dehidrogenasa [EC:1.1.1.42]	Negativa	0.0197
05100 Invasión bacteriana de células epiteliales. [PATH:ko05100]	<i>sipD</i> , <i>ipaD</i> , <i>bipD</i> ; invasina D	Positiva	0.0184
05150 Infección por Staphylococcus aureus [PATH:ko05150]	<i>mprF</i> , <i>fntC</i> ; fosfatidilglicerol lisiltransferasa [EC:2.3.2.3]	Negativa	0.0389

Nota. Principales genes expresados tomando como base la ortología KEGG