



1

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA INHIBICIÓN DEL *QUORUM*
SENSING Y LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Escherichia coli* ATCC 25922 y
Staphylococcus aureus ATCC 29213 EN PRESENCIA DE COMPUESTOS NATURALES
ANTIMICROBIANOS

Jerson Andrés Martínez Lozano

Trabajo de Grado para Optar el título de Magíster en Microbiología

Directora

Claudia Cristina Ortiz López, PhD

Codirector

German Alexis Zafra Sierra, PhD

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2021

Agradecimientos

A Dios por cada una de las buenas oportunidades que me ha brindado.

A mis padres por ser el apoyo incondicional en las adversidades.

A mis abuelos por ser el motor de mi vida.

A Angie Giselle por ser mi más grande inspiración, apoyo y paz en los momentos más desalentadores. Además, por su amor incondicional.

A la doctora Claudia por la oportunidad de aprender y liderarme en el camino de la ciencia, por creer en mis capacidades y siempre darme su apoyo.

Al doctor German por acompañarme y enseñarme por este camino del saber.

A mis amigos y compañeros del Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología GIBIM por todo el apoyo brindado y las palabras de aliento.

A los profesores de la Maestría en Microbiología por sus enseñanzas y aportes que enriquecieron mi camino como profesional.

Tabla de Contenido

INTRODUCCIÓN.....	10
1. MARCO CONCEPTUAL	19
1.1 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	19
1.1.1 RESISTENCIA INTRÍNSECA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.1.2 RESISTENCIA ADAPTATIVA.....	19
1.2 BIOPELÍCULAS.....	19
1.2.1 QUORUM SENSING	22
1.2.1.1 QUORUM SENSING EN E. COLI.....	22
1.2.1.2 QUORUM SENSING EN S. AUREUS	24
1.2.2 FORMACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS.....	26
1.2.3 FARMACORRESISTENCIA DE LAS BIOPELÍCULAS	29
1.3 ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS VEGETALES.....	32
1.3.1 ACVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	34
1.4 TRANSCRIPTÓMICA	36
2. ESTADO DEL ARTE	38
2.1 AE COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	38
2.2 GENES IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y EL SISTEMA QS EN S. AUREUS Y E. COLI....	43
2.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	45
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	53
5. HIPÓTESIS	54
6. OBJETIVOS	54
6.1 OBJETIVO GENERAL	54
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
7.1 MATERIALES.....	55
7.1.1 CEPAS BACTERIANAS	55
7.1.2 MATERIAL VEGETAL.....	55
7.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	56
7.2.1 SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	56
7.2.1.1 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO	57
7.2.1.2 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN E. COLI Y S. AUREUS.....	57

	4
7.2.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL AE DE LOTC II SOBRE <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i>	58
7.2.3.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	58
7.2.3.2 ACTIVIDAD ANTIMOTILIDAD SWIMMING EN <i>E. COLI</i>	59
7.2.3.3 ACTIVIDAD ANTIHEMOLÍTICA SOBRE <i>S. AUREUS</i>	60
7.2.4 ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DEL AE DE LOTC II SOBRE <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i>	61
7.2.5 ANÁLISIS DE BIOPELÍCULAS UTILIZANDO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)	61
7.2.6 OBTECIÓN DE BIOMASA DE BIOPELÍCULAS TRATADAS Y NO TRATADAS CON LOTC II EN BIORREACTORES 62	
7.2.7 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	63
7.2.8 OBTENCIÓN DE ADNC	63
7.2.9 DISEÑO DE PRIMERS	63
7.2.10 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES.....	64
7.2.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	65
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
8.1 CARACTERIZACIÓN DEL AE DE LOTC II POR GC/M.....	65
8.2 SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	67
8.2.1 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	67
8.2.2 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i>	69
8.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOTC II SOBRE <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i>	72
8.3.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOTC II	72
8.3.2 ACTIVIDAD ANTIMOTILIDAD SWIMMING EN <i>E. COLI</i>	75
8.3.3 EFECTO DE ACTIVIDAD ANTI-HEMOLÍTICA DEL AE DE LOTC II SOBRE <i>S. AUREUS</i>	78
8.4 ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOTC II SOBRE <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i>	80
8.5 ANÁLISIS DE BIOPELÍCULAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	84
8.6 OBTECIÓN DE BIOMASA DE BIOPELÍCULAS TRATADAS Y NO TRATADAS CON EL AE DE LOTC II EN BIORREACTORES DE VIDRIO DE 50 ML.....	87
8.7 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	89
8.8 DISEÑO DE PRIMERS	90
8.9 EVALUACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE LOS CEBADORES POR RT-QPCR	93
8.10 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DURANTE LA COMUNICACIÓN QS Y LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS	95
8.10.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN <i>E. COLI</i>	96
8.10.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN <i>S. AUREUS</i>	101

8.11	POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOTC II DURANTE LA COMUNICACIÓN QS Y LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i>	105
9.	CONCLUSIONES	108
10.	BIBLIOGRAFÍA	109
11.	ANEXOS	129

Lista de Tablas

Tabla 1. Revisión Bibliográfica de actividad biológica de diferentes AE sobre diferentes microorganismos.

Tabla 2. Antecedentes del efecto AE con mayor contenido de fenoles frente a diferentes bacterias.

Tabla 3. Revisión bibliográfica de actividad antibiopelícula y antiQS de diferentes AE sobre *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 4. Genes implicados en la regulación del sistema QS y la formación de biopelículas de *S. aureus*.

Tabla 5. Genes implicados en la regulación del sistema QS y la formación biopelículas en *E. coli*.

Tabla 6. Revisión bibliográfica del efecto transcriptómico de diferentes AE sobre bacterias patógenas.

Tabla 7. Principales cinco componentes mayoritarios presentes en los AE evaluados.

Tabla 8. Actividad antibacteriana del AE de LOTC II sobre *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 9. Efecto en la formación de biopelículas de concentraciones subinhibitorias del AE de LOTC II sobre *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 10. Evaluación de la concentración y calidad del ARN total extraído de las muestras tratadas y no tratadas con LOTC II.

Tabla 11. Lista de genes y sus respectivos cebadores para la evaluación del efecto de LOTC II sobre el transcriptoma de *E. coli* y *S. aureus* durante la comunicación QS y la formación de biopelículas.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema general del sistema de señalización QS en *E. coli*.
- Figura 2.** Esquema del sistema de señalización QS en *S. aureus*.
- Figura 3.** Proceso general de formación de biopelículas.
- Figura 4.** Estructura química de los principales terpenos fenólicos.
- Figura 5.** Esquema general del posible efecto de los AE sobre el sistema QS.
- Figura 6.** Esquema general de la metodología experimental realizada.
- Figura 7.** Cinética de crecimiento planctónico de *E. coli* en cada medio seleccionado.
- Figura 8.** Cinética de crecimiento planctónico de *S. aureus* en cada medio seleccionado.
- Figura 9.** Cuantificación de la formación de biopelícula de *E. coli* en los medios evaluados.
- Figura 10.** Cuantificación de la formación de biopelícula de *S. aureus* en los medios evaluados.
- Figura 11.** Efecto de las concentraciones subinhibitorias del AE de LOTC II sobre *E. coli*.
- Figura 12.** Efecto del AE de LOTC II a concentraciones subinhibitorias sobre la actividad hemolítica de *S. aureus*.
- Figura 13.** Efecto antibiopelícula de diferentes concentraciones subinhibitorias del AE de LOTC II sobre *E. coli* y *S. aureus*.
- Figura 14.** Efecto de concentraciones subinhibitorias del AE de LOTC II sobre las células planctónicas de *E. coli* y *S. aureus*.
- Figura 15.** Micrografías SEM que muestran el efecto del AE de LOTC II sobre la morfología y estructura de las biopelículas.
- Figura 16.** Evaluación del efecto inhibitorio de LOTC II a 0,37 mg/mL sobre las células planctónicas y sésiles inoculadas en biorreactores.
- Figura 17.** Picos de amplificación de los genes evaluados en muestras planctónicas por RT-qPCR.
- Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos por RT-qPCR de cada gen evaluado en *E. coli* ATCC 25922.
- Figura 19.** Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos por RT-qPCR de cada gen evaluado en *S. aureus* ATCC 29213.

Figura 20. Perfiles transcripcionales de *E. coli* ATCC 25922 en estado planctónico y en biopelícula tratadas con o sin LOTC II.

Figura 21. Perfiles transcripcionales de *S. aureus* ATCC 29213 en estado planctónico y en biopelícula tratadas con o sin LOTC II.

Figura 22. Posibles mecanismos antagonistas de LOTC II sobre la formación de biopelículas de *E. coli* ATCC 25922.

Figura 23. Posibles mecanismos antagonistas de LOTC II sobre la formación de biopelículas de *S. aureus* ATCC 29213.

Glosario

Aceite Esencial (AE): Mezcla compleja de sustancias aromáticas volátiles de las plantas vegetales.

Análisis de expresión génica: Técnica de la Biología Molecular que permite conocer y cuantificar la expresión de genes específicos en la célula, mediante la medición de ARNm que están presentes en un momento determinado.

Biopelículas: Comunidades de microorganismos adheridas a una superficie, organizadas y envueltas en una matriz de exopolisacárido que las protege de cambios desfavorables en el entorno.

Quorum sensing (QS): Sistema de comunicación microbiano dependiente del umbral celular, en el cual se producen pequeñas moléculas “autoinductoras” que se serán reconocidas por la célula y regularán sistemas transcripcionales.

Resistencia Antimicrobiana (RAM): Capacidad que desarrollan los microorganismos, incluidos bacterias, virus, hongos y parásitos, cuando se adaptan y crecen en presencia de agentes terapéuticos que antes ocasionaban inhibición o muerte celular.

Resumen

Título: ANALISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA INHIBICIÓN DEL QUORUM SENSING Y LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 EN PRESENCIA DE COMPUESTOS NATURALES ANTIMICROBIANOS*

Autor: Jerson Andrés Martínez Lozano**

Palabras Clave: biopelículas, *Quorum sensing*, análisis de expresión génica, aceites esenciales

Las infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos convencionales constituyen hoy en día una de las causas más importantes de muerte en el mundo. En general, las bacterias en estado sésil o de biopelícula, persisten en el hospedero mediante una estrategia de supervivencia extraordinaria que no necesariamente se traduce en una virulencia agresiva. Por lo anterior, existe un gran interés en identificar nuevos compuestos antimicrobianos que inhiban el crecimiento planctónico y sésil de bacterias patógenas. En este estudio, se evaluó la actividad biológica del AE de *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II (LOTIC II) sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 y su capacidad de alterar la expresión de genes relacionados con la formación de biopelículas, comunicación *Quorum Sensing* (QS) y virulencia. La actividad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de microdilución en caldo. La actividad sobre la formación y estructura de la biopelícula se evaluó mediante la técnica de cristal violeta y análisis SEM. Se evaluó el efecto de los AE sobre la inhibición de la actividad hemolítica de *S. aureus* ATCC 29213 mediante microtitulación en placa. La capacidad de motilidad *swimming* de *E. coli* se determinó mediante siembra en medio semisólido en cajas de Petri. El análisis de expresión diferencial de genes se realizó mediante la herramienta molecular RT-qPCR. Los resultados obtenidos indicaron que el AE LOTIC II presentó un efecto antimicrobiano en Concentrações Mínimas Inibitorias y Bactericidas (CMI y CMB) de 0.45 y 0.75 mg/mL, respectivamente sobre los dos microorganismos. El AE de LOTIC II presentó actividad antibiopelícula, inhibiendo la formación de la biopelícula de los microorganismos evaluados mayor a un 70%, en concentraciones sub-inhedorias. El efecto antibiopelícula del AE de LOTIC II, fue evidenciado mediante micrografías SEM, que demostraron la alteración morfológica y estructural de la biopelícula y la membrana bacteriana. En el caso de *E. coli* el AE LOTIC II inhibió de la motilidad en un 58% en concentraciones sub-inhedorias. Por otra parte, el AE LOTIC II inhibió la actividad hemolítica de *S. aureus* por encima del 50% en concentraciones sub-CMI₅₀ de LOTIC II, lo que sugiere una alteración de las vías de señalización QS. Mediante la correlación de los cambios en la expresión diferencial de genes con las rutas metabólicas relacionadas, se determinó que el posible mecanismo de acción del AE LOTIC II sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 está relacionado con la inhibición de componentes importantes en la motilidad, adhesión a superficies, agregación celular, producción de exopolisacárido y reguladores transcripcionales de la comunicación QS y formación de biopelículas. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron identificar posibles mecanismos de acción de LOTIC II sobre la formación de biopelículas que podrían servir como base para el desarrollo de nuevos estudios enfocados en la determinación de dianas terapéuticas y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

* Trabajo de Grado

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

Abstract

Title: GENE EXPRESSION ANALYSIS DURING INHIBITION OF QUORUM SENSING AND BIOFILM FORMATION OF *Escherichia coli* ATCC 25922 AND *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 IN THE PRESENCE OF NATURAL ANTIMICROBIAL COMPOUNDS*

Author: Jerson Andrés Martínez Lozano **

Key Words: biofilms, Quorum sensing, gene expression analysis, essential oils

Infections caused by microorganisms resistant to conventional antibiotics are today one of the most important causes of death in the world. In general, bacteria in a sessile or biofilm state persist in the host through an extraordinary survival strategy that does not necessarily translate into aggressive virulence. Therefore, there is great interest in identifying new antimicrobial compounds that inhibit the planktonic and sessile growth of pathogenic bacteria. In this study, the biological activity of *Lippia origanoides* thymol-carvacrol chemotype II (LOTC II) EO on *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 29213 and its ability to alter the expression of genes related to biofilm formation was evaluated, communication Quorum Sensing (QS) and virulence. The antimicrobial activity was determined by the broth microdilution technique. The activity on biofilm formation and structure was evaluated by crystal violet technique and SEM analysis. The effect of EOs on the inhibition of the hemolytic activity of *S. aureus* ATCC 29213 was evaluated by microtiter plate. The swimming motility capacity of *E. coli* was determined by seeding in semi-solid medium in Petri dishes. Differential gene expression analysis was performed using the RT-qPCR molecular tool. The results obtained indicated that EO LOTC II had an antimicrobial effect at Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC) of 0.45 and 0.75 mg/mL, respectively on the two microorganisms. The EO of LOTC II presented antibiofilm activity, inhibiting the formation of the biofilm of the microorganisms evaluated greater than 70%, in sub-inhibitory concentrations. The antibiofilm effect of LOTC II EO was evidenced by SEM micrographs, which demonstrated the morphological and structural alteration of the biofilm and the bacterial membrane. In the case of *E. coli*, EO LOTC II inhibited motility by 58% at sub-inhibitory concentrations. On the other hand, LOTC AE inhibited the hemolytic activity of *S. aureus* by over 50% at sub-MIC50 concentrations of LOTC II, suggesting an alteration of QS signaling pathways. By correlating changes in differential gene expression with related metabolic pathways, it was determined that the possible mechanism of action of AE LOTC II on *E. coli* ATCC 259922 and *S. aureus* ATCC 29213 is related to the inhibition of important components in motility, surface adhesion, cell aggregation, exopolysaccharide production, and transcriptional regulators of QS communication and biofilm formation. The results obtained in this study made it possible to identify possible mechanisms of action of LOTC II on the formation of biofilms that could serve as a basis for the development of new studies focused on the determination of therapeutic targets and the development of new antimicrobial drugs.

* Degree work

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

Introducción

La RAM es considerada un problema de salud pública a nivel mundial (Schrader *et al.*, 2020). La RAM se desarrolla cuando se presentan diversos mecanismos de fisiología bacteriana que incluyen variabilidad genética, modificación de permeabilidad de membrana y excreción del compuesto, entre otros, sumado al uso indebido y excesivo de los antibióticos (Dadgostar, 2019). Así mismo, el aumento vertiginoso de la resistencia antimicrobiana ha dificultado el tratamiento de enfermedades infecciosas mediante el uso de antibióticos convencionales, incrementado el riesgo de propagación de infecciones causadas por cepas resistentes y multirresistentes (Magiorakos *et al.* 2012; Friedman *et al.*, 2016; Tacconelli *et al.*, 2018). Así mismo, las infecciones transmitidas por microorganismos resistentes, se asocian a estancias hospitalarias prolongadas y al aumento de la morbilidad y mortalidad, que conducen al fracaso terapéutico convencional (Andersson, 2003; Sharma *et al.*, 2016).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el programa *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System* (GLASS, por sus siglas en inglés), la resistencia a los antibióticos en infecciones bacterianas severas constituye un problema de relevancia en países de alto, mediano y bajo ingreso. Por otro lado, la resistencia frente al menos un antibiótico, ha aumentado entre 35 a 50% en los últimos años. Según los datos del sistema GLASS entre las bacterias resistentes más frecuentes se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella* spp. (OMS, 2018).

Una de las características microbianas que favorece la RAM es la capacidad de formación de biopelículas. Una biopelícula se define como una población de microorganismos adheridos a una superficie, envueltos y organizados en una matriz de exopolisacárido que les protege (Jamal *et al.*, 2018). Por consiguiente, las biopelículas proporcionan un medio para que los microorganismos se protejan contra el efecto de los antibióticos convencionales (Patel, 2005). De acuerdo con estudios recientes (Bowler *et al.*, 2020), las biopelículas constituyen un obstáculo para la acción de los antimicrobianos debido a su naturaleza compacta, que implica mecanismos que favorecen la supervivencia tales como: comunicación QS, barrera de difusión del Exopolisacárido (EPS), velocidad específica de crecimiento lenta, transferencia horizontal de genes de resistencia, mecanismos de comunicación celular, presencia de células persistentes, y alteración del pH, entre otros.

Durante las etapas de formación, maduración y dispersión de las biopelículas es necesario que se presenten sistemas de comunicación celular, dentro de los cuales está el sistema de señalización celular *Quorum Sensing* (QS). El sistema QS es un sistema dependiente del umbral de densidad celular y del reconocimiento de pequeñas moléculas llamadas autoinductores (Whiteley *et al.* 2017; Vadakkan *et al.* 2018). La red de regulación QS está involucrada en el comportamiento comunitario de las bacterias y la regulación de características asociadas a la patogenicidad, por ejemplo, la expresión de factores de virulencia y los mecanismos de acción frente a los antibióticos convencionales. Por lo tanto, de acuerdo con el microorganismo estudiado el sistema QS intervendrá en diferentes etapas del desarrollo de biopelículas y a su vez promoverá una mayor competencia genética; esto se ha evidenciado en la mayoría de las bacterias patógenas humanas (Bhaat, 2018; Paramanatham *et al.*, 2018). La formación de biopelículas y el sistema QS son

regulados por la expresión positiva o negativa de diferentes genes específicos y esta regulación va a depender de las características detectadas en el medio por los microorganismos.

Las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas se asocian frecuentemente a especies bacterianas, tales como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, entre otros. *E. coli* y *S. aureus* se presentan de manera ubicua en diferentes ambientes como agua, suelo, aire y la piel. Estos patógenos se consideran oportunistas en infecciones hospitalarias y de comunidad, debido a que poseen los mecanismos necesarios para sobrevivir en condiciones desfavorables (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). Además, *E. coli* y *S. aureus* cuentan con un amplio repertorio de factores de virulencia y toxinas que les permite sobrevivir al ataque del sistema inmune del huésped y causar un amplio rango de infecciones. Lo anterior, está directamente asociado con la capacidad de formar biopelículas sobre diferentes tipos de superficies, especialmente dispositivos médicos, favoreciendo la adquisición de infecciones asociadas a la atención en salud. Por otra parte, la formación de biopelículas favorece la adquisición de genes de resistencia contra múltiples fármacos (David and Daum, 2017; Rossi *et al.*, 2018).

La formación de biopelículas de *E. coli* y *S. aureus* contribuye a la cronicidad de las infecciones y su recurrencia, porque en las infecciones bacterianas, las células presentes en las biopelículas están protegidas contra la respuesta inmune del hospedero y contra la acción de diversos antibióticos, por lo cual, las células recubiertas y desprendidas de las biopelículas están involucradas en la persistencia de la infección. De esta forma, las biopelículas pueden desempeñar

un papel muy importante en el desarrollo de diferentes infecciones complicadas en el sistema hospitalario (Li *et al.*, 2016; Penesyan *et al.*, 2016; Paramanatham *et al.*, 2018).

Debido al grave problema de salud pública que representa la RAM, durante los últimos años se han hecho grandes esfuerzos para investigar y desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos alternativos al uso de antibióticos convencionales contra enfermedades infecciosas. Teniendo en cuenta que los mecanismos de acción de los antibióticos convencionales (inactivación enzimática, modificación de dianas, alteración de la permeabilidad) no están siendo efectivos (Ali *et al.*, 2018; Reygaert *et al.*, 2018), se ha motivado la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos que interfieran en rutas metabólicas diferentes a las convencionales mencionadas anteriormente. Por ejemplo, rutas involucradas en la señalización celular QS y en la formación de biopelículas (Lin *et al.* 2018).

Entre las alternativas al uso de antibióticos convencionales, se han estudiado diversos compuestos, tales como, nanopartículas (Nisar *et al.*, 2019; Gomez-Sequeda *et al.*, 2020), péptidos antimicrobianos (Nutti *et al.*, 2017; Gomez-Sequeda *et al.*, 2020) vacunas, bacteriocinas, prebióticos simbióticos, fagos (Sharma *et al.*, 2018) y productos derivados de plantas (Chandra *et al.*, 2017). Esta última ha sido una de las alternativas con mayor potencial entre las cuales se encuentran los Aceites Esenciales (AE) y los Extractos Vegetales (EV), capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, la formación de biopelículas y el sistema de comunicación QS (Bouyahya *et al.*, 2017; Mittal *et al.* 2019). Sin embargo, aún continúa siendo un desafío de investigación poder demostrar la regulación positiva o negativa que las moléculas derivadas de plantas podrían tener sobre los genes involucrados en las redes de señalización del QS y la formación de

biopelículas. Estos resultados podrían permitir la identificación de un posible mecanismo de acción, en la búsqueda de compuestos que contrarresten la resistencia bacteriana.

Durante los últimos años diversos autores han demostrado que los AE exhiben actividades inhibitorias de amplio espectro contra diferentes patógenos Gram negativos y Gram positivos (Chandra *et al.*, 2017; Bouyahya *et al.*, 2019; Alves *et al.* 2019). Según estudios recientes, se ha logrado determinar que el efecto principal de los AE es la desestabilización de la membrana, debido a su naturaleza lipofílica que les permite permear la membrana y la pared celular (Bouyahya *et al.*, 2019; Tariq *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que el efecto de los AE sobre los microorganismos también se atribuye a la composición química de sus componentes, entre los cuales se ha destacado la actividad biológica de los ácidos fenólicos (Bassolé y Juliani 2012; Alves *et al.* 2019; Gedikoğlu *et al.* 2019). Sin embargo, debido a la gran biodiversidad de los AE es necesario identificar los quimiotipos más promisorios, las moléculas con mayor efecto antibiótico y sus posibles mecanismos de acción.

En relación con los componentes de los AEs y EVs, el mecanismo de acción de ácidos fenólicos, tales como, el carvacrol y el timol, se ha relacionado principalmente con una permeabilidad acelerada de la membrana, lo que concluiría con una ruptura de la misma, causando el deterioro del potencial de membrana, disrupción de los gradientes de pH, fuga de nutrientes y muerte celular (Raut *et al.*, 2014; Cáceres *et al.*, 2020). Además, se ha sugerido que los compuestos fenólicos de los AEs podrían inhibir rutas de comunicación del QS y formación de biopelículas mediante la interacción con reguladores transcripcionales y moléculas señalizadoras. Sin embargo, los mecanismos aún no han sido completamente descritos (Bouyahya *et al.*, 2019).

Durante los últimos años, el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, ha concentrado sus esfuerzos en la investigación del efecto y posibles mecanismos de actividad antimicrobiana, anti QS y antibiopelícula, de diferentes compuestos diferentes a los antibióticos convencionales, sobre diferentes bacterias patógenas. El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto marco financiado por MinCiencias, en el cual se evaluó la actividad antimicrobiana, anti QS y antibiopelícula, de 17 AE y cinco Extractos Vegetales (EV) sobre diferentes microorganismos patógenos (Cáceres *et al.*, 2020; Gómez-Sequeda *et al.*, 2020). Además, estos estudios mostraron que el AE de *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II (LOTC II) presentó los mayores valores de actividad antimicrobiana, antibiopelícula y anti-QS sobre las siguientes bacterias patógenas: *E. coli* O157:H7, *E. coli* O33 *E. coli* ATCC 25922, *S. epidermidis*, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* Resistente a Metilina (SARM). Todos los AE y EV provienen de especies nativas subcultivadas en el CENIVAM y contaron con el permiso de acceso a recursos genéticos y productos derivados para investigación científica con fines de prospección biológica del Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Por lo anterior, se hace necesario el uso de herramientas moleculares para evaluar el posible efecto del aceite esencial sobre redes de regulación relacionadas a la formación de biopelículas, comunicación QS y virulencia. En los últimos años, han surgido diferentes tipos de herramientas moleculares, que permiten establecer la relación entre los cambios de la expresión diferencial de genes con el efecto de compuestos antimicrobianos. Una de las herramientas moleculares que permite evidenciar el efecto de compuestos naturales con actividad biológica sobre la expresión de genes involucrados en QS y rutas relacionadas con la formación de biopelículas, es la transcriptómica. Durante los

últimos años diversos autores han utilizado herramientas moleculares como la secuenciación masiva de ARN y la RT-qPCR para evaluar los cambios transcripcionales de células bacterianas asociadas en biopelículas (Atshan et al., 2013; Carvalho *et al.*, 2014; Mackowiak *et al.*, 2018; Mello et al., 2020).

En diversos estudios transcriptómicos se ha demostrado que algunos compuestos antimicrobianos tienen efecto sobre moléculas reguladoras transcripcionales, lo cual influye en la regulación positiva o negativa de genes relacionados con el crecimiento, patogenicidad y virulencia de los microorganismos. Las herramientas moleculares también han sido usadas para evaluar los cambios en la regulación de genes relacionados al efecto de compuestos antimicrobianos en bacterias patógenas (Meason-Smith *et al.*, 2018; Agrimonti *et al.*, 2019; Ghasemian *et al.*, 2020). 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, con un posible efecto sobre las vías de comunicación celular y formación de biopelículas. Por lo tanto, en este estudio se determinaron posibles mecanismos de acción del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II durante la inhibición del QS y la formación de biopelículas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 mediante el análisis de la expresión génica.

1. Marco conceptual

1.1 Resistencia antimicrobiana

La adquisición de genes de resistencia por bacterias susceptibles a partir de bacterias resistentes, se puede dar a través de mecanismos de transferencia genética tales como, conjugación, transformación o transducción, que facilitan la incorporación de material genético al genoma o al plásmido (Holmes *et al.*, 2016). Los mecanismos mencionados consisten en evitar que el agente antimicrobiano se incorpore a la célula bacteriana y lo exporte de manera activa hacia el medio extracelular, sin permitir que el compuesto alcance su objetivo. Este mecanismo se conoce como Bombas de Eflujo (BE). Se ha descrito que los genes que codifican para las proteínas BE se encuentran en todos los organismos y se organizan en cinco familias de proteínas BE: *ATP Binding Cassette* (ABC), *Major Facilitator Superfamily* (MFS), *Multidrug and Toxic-compound Extrusion* (MATE), *Small Multidrug Resistance* (SMR) y *Resistance Nodulation Division* (RND). Un solo microorganismo puede expresar una o más de una familia de estas proteínas, como el caso de *E. coli* y otras bacterias Gram negativas (Kaatz *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 2016; Marston *et al.*, 2016).

1.1.1 Resistencia adaptativa

La resistencia adaptativa es la capacidad de las bacterias de adquirir o desarrollar mecanismos de defensa frente a los compuestos antimicrobianos. La resistencia adaptativa es de carácter fenotípico, aunque algunos factores genéticos pueden influir en la activación de estos mecanismos. El fenómeno de “indiferencia al fármaco”, consiste en que las bacterias que no se están dividiendo y pueden ser resistentes a la acción del fármaco. Según este fenómeno, las bacterias que no tienen

suficientes nutrientes para tener un metabolismo activo pueden llegar a ser completamente resistentes a antibióticos bactericidas (Snieszco, 1958). En este estado de latencia, algunas células bacterianas pueden adquirir resistencia y contribuir a la resistencia de células que no fueron completamente eliminadas por el tratamiento. Por otro lado, se ha demostrado que los agentes antimicrobianos no eliminan completamente a una población de bacterias en crecimiento activo. La población bacteriana que sobrevive al efecto del fármaco desarrolla nuevos mecanismos de resistencia que podrán ser adquiridos por nuevas generaciones de bacterias. Estos mecanismos pueden ser desarrollados por medio del sistema SOS, un sistema mediante el cual se produce una respuesta frente a daños en el ADN, impidiendo la replicación; o a través de un estado de reparación de ADN en el cual las bacterias entrarían en un estado de no división celular, generando un fenotipo resistente (Holmes *et al.*, 2016; Marston *et al.*, 2016). También se ha demostrado que las células bacterianas inmersas en las matrices de polisacáridos que forman parte de las biopelículas son menos accesibles a la difusión del antimicrobiano. Al interior de las biopelículas, las células pueden estar en un estado de latencia, a causa de limitantes tales como microambientes anoxigénicos y carencia de nutrientes, entre otros. Por lo tanto, en este estado la gran mayoría de células no se encuentran en replicación o con un metabolismo completamente activo, evitando que el agente antimicrobiano tenga efecto (Kaatz *et al.*, 1993; Marston *et al.*, 2016).

1.2 Biopelículas

Las células bacterianas pueden cambiar de estado sésil a planctónico y viceversa. Las sésiles generan una matriz de Sustancia Polimérica Extracelular (EPS, por sus siglas en inglés), dependiendo del umbral celular y la regulación positiva o negativa de genes específicos. Las

comunidades de bacterias complejamente organizadas, que se fijan a una superficie por medio de la generación de una matriz constituida por EPS, se denomina biopelícula (Costerton, 1999; Vestby *et al.*, 2020). Las biopelículas pueden estar compuestas por una o diferentes especies de microorganismos y se pueden formar en una amplia variedad de superficies que incluyen tejidos vivos, materiales de dispositivos médicos, tuberías industriales, sistemas de agua potable o sistemas acuáticos naturales u otros materiales de diferente complejidad (Nadell *et al.*, 2008; Marangoni *et al.*, 2013; Dang y Lovell, 2016). Una biopelícula madura comprende células microbianas y EPS con arquitectura definida, proporcionando un ambiente óptimo para el intercambio de material genético entre células (Dang y Lovell, 2016). En situaciones donde la cantidad de sustrato es mínima, las bacterias inmersas en las biopelículas activan estrategias propias de cada especie; por ejemplo, algunas cambiarán su cubierta para hacerla más hidrofóbica y dirigirse hacia las paredes, donde encontrarán alguna molécula orgánica o mineral, que permita un consumo energético mínimo. El estado semilátente o de metabolismo retardado podría ser una explicación de la resistencia a la actividad inhibitoria que presentan las biopelículas (Marangoni *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015; Arciola *et al.*, 2018; Jamal *et al.*, 2018).

El cambio de estado morfológico de células planctónicas a sésiles y viceversa, está relacionado con la regulación de genes específicos y la regulación positiva o negativa de estos genes, va a estar directamente relacionada con mecanismos de señalización celular, dentro de los cuales se destaca el sistema QS (Jiang *et al.*, 2019).

1.2.1 *Quorum Sensing*

A través de la evolución, los microorganismos han desarrollado sistemas de comunicación para interactuar y adaptarse al medio que habitan. El sistema mediante el cual las bacterias coordinan interacciones entre sí y con otros microorganismos se conoce como QS (Jiang *et al.*, 2019). El sistema QS es un sistema de comunicación celular dependiente de la densidad celular, en el cual las bacterias producen moléculas de señalización denominadas autoinductores, que se acumulan durante etapas específicas del crecimiento, aunque su nivel de producción también pueda verse influido por el entorno (Mukherjee y Bassler, 2019). Mediante los autoinductores las bacterias pueden percibir la densidad de su población o de otras bacterias en un ambiente (Yao *et al.*, 2006). Cuando los autoinductores alcanzan un umbral de concentración, mediado por la densidad celular, interactúan con reguladores transcripcionales específicos, que a su vez van a ser dirigidos hacia genes específicos, lo que regulará de forma positiva o negativamente un grupo específico de genes, dependiendo de las necesidades metabólicas hacia el entorno (Sperandio *et al.*, 2001; Papenfort and Bassler, 2016; Bouyahya *et al.*, 2017). El sistema QS regula diferentes características bacterianas como la formación de biopelículas, maduración y dispersión de las biopelículas, producción de toxinas, motilidad, generación de metabolitos secundarios, pigmentación, esporulación y transferencia de plásmidos y ADN extracelular (Zhao and Ding, 2020).

1.2.1.1 *Quorum sensing en E. coli*

El principal sistema de señalización QS en *E. coli* es el sistema autoinductor-2, que se basa en la producción de furanosil borato diéster denominado AI-2 (Li *et al.*, 2021). El AI-2 constituye un sistema inter e intra-especie, por lo que está presente en bacterias Gram negativas y Gram

positivas. La producción de AI-2 en *E. coli* está regulada por el gen *LuxS*, que a su vez regula la producción de la enzima *luxS*, encargada de la reacción química de s-ribosil homocisteína en homocisteína y Dihidropirimidina Dihidrogenasa (DPD). Seguidamente, el DPD se cicla para producir furanonas, las cuales constituyen el precursor del AI-2. El AI-2 se sintetiza mediante la metaloenzima AI-2 sintetasa mediante las furanonas. Cuando AI-2 alcanza el umbral por densidad celular, es detectado en la membrana por transportadores específicos. Una vez internalizado en la célula, la molécula AI-2 sufre una fosforilación que desencadena una vía de señalización que termina regulando el operón *LuxS*, como se muestra en la **Figura 1**. El operón *LuxS* regula factores de transcripción y genes *Lee*, encargados de la producción de virulencia, motilidad, adhesión y síntesis de proteínas (Rossi *et al.*, 2017). Los genes regulados mediante AI-2 también codifican para transportadores responsables de la captación de AI-2. El sistema AI-2 en *E. coli* regula características, tales como, la motilidad, la adhesión a superficies, producción de EPS, formación y maduración de biopelículas y la producción de toxinas (Rossi *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2018). Aunque *E. coli* no presenta un sistema de regulación QS dependiente de AHL (autoinductor-1), como la gran mayoría de bacterias Gram negativas, sí posee un homólogo LuxR (SdiA) del sistema AHL, un receptor de AHL y un regulador transcripcional, con el que pueden detectar las AHLs producidas por otras bacterias en el medio para regular su metabolismo. Se ha descrito a SdiA como principal regulador de los genes de división celular, de producción de flagelos, factores de virulencia y resistencia (Sperandio *et al.*, 2002; Li *et al.* 2021; Whiteley *et al.*, 2017).

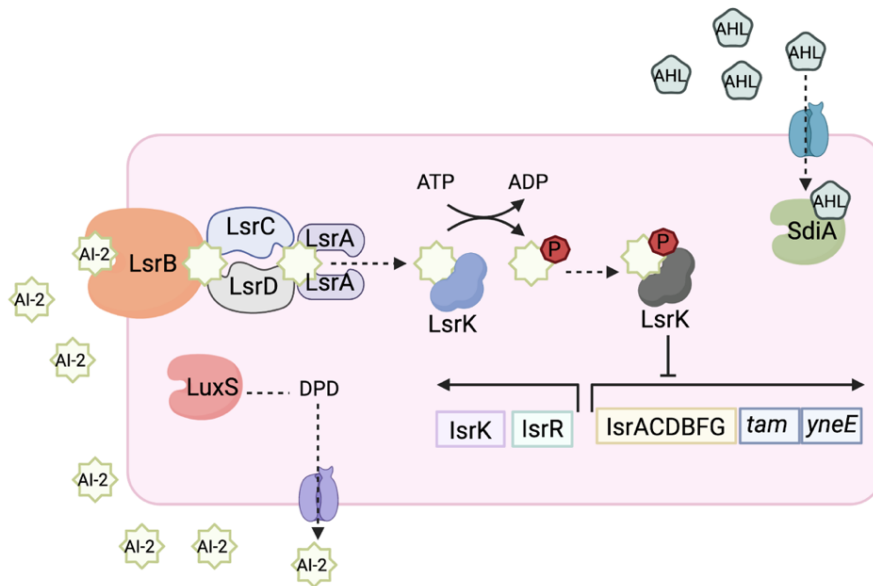


Figura 1. Esquema general del sistema de señalización QS en *E. coli*. Autoinductores AI-2, Proteínas de reconocimiento QS (LsrB, LsrC, LsrD, LsrA) regulador transcripcional *LsrK*.

1.2.1.2 Quorum sensing en *S. aureus*

El sistema de regulación QS en *S. aureus* es denominado sistema agr (regulador de genes accesorios de la expresión de genes) y se basa en la captación de autoinductores peptídicos (AIP) como moléculas de señalización. Los AIP se secretan extracelularmente y su acumulación es detectada por los receptores histidina quinasa AgrC de la membrana externa. El gen *agrD* está involucrado en la expresión de las moléculas peptídicas autoinductoras al citoplasma. En el citoplasma los AIP sufren una modificación postraduccional de agregación de tiolactona (lactona, lationina o isoprenilo). Esta modificación permite el transporte de los AIP hacia el medio extracelular, como un oligopéptido a través de la proteína de membrana AgrB. Cuando los AIP alcanzan el umbral de concentración, son reconocidos por la proteína de membrana AgrC. Posteriormente, las señales provocadas por la unión entre los AIP y la proteína AgrC generan la fosforilación de la proteína AgrA. De esta forma, la fosforilación de la proteína AgrA activa vías

de señalización dirigidas a genes objetivo tales como el sistema agr, como se ilustra en la **Figura 2**. Por ejemplo, el sistema Agr de *S. aureus* regula características tales como la producción de hemolisinas, toxinas y factores de virulencia, producción de EPS, adhesión a superficies abióticas, colonización de tejidos, maduración de biopelículas, dispersión de células cubiertas de EPS, secreción de proteasa, regulación de genes de supervivencia, producción de proteínas de control de catabolitos, entre otros (Kong y Otto, 2006; Utari y Quax., 2017; Malachowa y DeLeo, 2018). El sistema agr en *S. aureus* regula características tales como la producción de hemolisinas, toxinas y factores de virulencia, producción de EPS, adhesión a superficies abióticas, colonización de tejidos, maduración de biopelículas, dispersión de células cubiertas de EPS, secreción de proteasa, regulación de genes de supervivencia, producción de proteínas de control de catabolitos, entre otros (Kong y Otto, 2006; Utari y Quax., 2017; Malachowa y DeLeo, 2018).

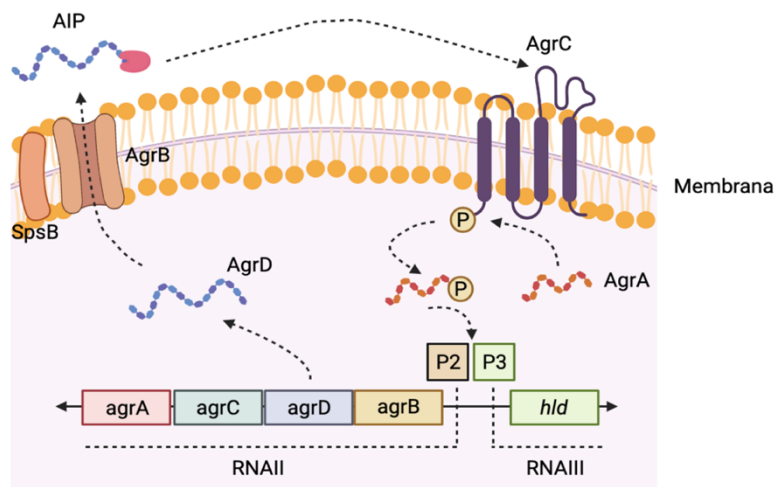


Figura 2. Esquema del sistema de señalización QS en *S. aureus*. Genes del sistema agr (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*), operones P2-P3, reguladores transcripcionales *RNA II-RNA III*.

1.2.2 Formación de las biopelículas

Para la formación de biopelículas son esenciales dos características: una poblacional, es decir, el componente de comunidad mono o polimicrobiana sobre una superficie sólida, en la cual adquirirá una estructura tridimensional; y otra morfológica que está asociada con la formación de una matriz extracelular de polímeros complejos, excretados por la comunidad microbiana (Ferreira *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2015; López, 2010; Anderson, 2008). En la **Figura 3**, se presentan las cinco etapas de la formación de biopelículas, las cuales se describen a continuación:

- **Fijación a la superficie:** La biopelícula puede desarrollarse sobre cualquier tipo de superficie, gracias a que previamente las células sésiles entran en contacto con la materia orgánica o inorgánica presente en el agua. En este contacto agua-superficie se deposita una capa orgánica que cambia las propiedades químicas y físicas de la superficie y mejora las posibilidades de fijación de las bacterias. La fijación de las células bacterianas es un proceso complejo regulado por diferentes características, tales como el medio de crecimiento, los nutrientes y la superficie de formación. La adhesión puede diferir según se trate de bacterias Gram negativas y Gram positivas. En general, la adhesión de las bacterias al sustrato puede ser activa (a través de flagelos, pili, adhesinas, cápsulas, y cargas de superficie) o pasiva (mediante gravedad, difusión y dinámica de fluidos) (Duta *et al.*, 2018). En condiciones normales las células bacterianas son repelidas de la superficie por el acondicionamiento superficial. Durante esta etapa de unión reversible, las células bacterianas aun muestran movimiento browniano y se eliminan fácilmente al lavar (**Figura 3a**) (Verderosa *et al.*, 2019).

- **Formación de monocapa y producción de matriz:** En esta etapa ya se ha alcanzado la unión irreversible de las células a la superficie, lo cual dará paso a la división celular, en donde las células adheridas se agruparán en una monocapa (**Figura 3b**). La unión irreversible significa el anclaje de apéndices bacterianos y la producción de exopolímeros (Duta *et al.*, 2018). La composición del exopolisacárido difiere en cada microorganismo y varía en composición, pudiéndose encontrar compuestos como alginato, celulosa, glucosa, galactosa, glucosamina, proteínas libres y estructurales, entre otros. La fijación y la resistencia de las bacterias en la biopelícula se debe a la regulación de diferentes genes que codifican nuevas proteínas estructurales y enzimas. A partir de la producción de la matriz extracelular se va creando una comunidad mas heterogénea (Verderosa *et al.*, 2019).

- **Formación de microcolonias y multicapa:** A partir de la producción del exopolisacárido se irán creando microambientes en donde las bacterias se van a organizar dependiendo de las características del entorno y de su estado metabólico, lo que dará lugar a la formación de microcolonias y por consiguiente una multicapa celular (**Figura 3c**) (Duta *et al.*, 2018). En cada multicapa se generarán canales de agua para la excreción de sustancias y la acumulación de metabolitos secundarios será característico de cada microambiente, según sus características fisicoquímicas. Las células presentes en cada multicapa tendrán un metabolismo energético diferente, acorde a sus necesidades nutricionales y estas regulaciones de comunidad estarán mediadas por mecanismos de comunicación celular (Van Wolferen y Albers, 2018).

- **Maduración:** Durante la maduración de la biopelícula (glicocalix) se presenta una combinación de polímeros polianiónicos, limosos y pegajosos que se excreta al exterior para mantener una adhesión entre células-células y células-superficie. En esta etapa, la composición del

exopolímero está dada por polisacáridos-glicoproteínas (glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina), proteínas como polisacárido Intercelular Adhesina (PIA) y Poli, B-N acetil glucosamina (PNAG), fosfolípidos, ácidos teicoicos y ácidos nucleicos. Este glucocalix se excreta desde la pared celular bacteriana en formación radicular (tela de araña) y se estructura a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas que suman la capacidad de adherencia o captación de nutrientes por intercambio iónico. La maduración de la matriz extracelular formará la estructura tridimensional característica de cada biopelícula (**Figura 3d**). Una biopelícula madura está compuesta por alrededor de 75 a 95% de matriz de EPS y de alrededor de 5-25% de células bacterianas (Arciola y Montanaro, 2018).

- **Dispersión:** La división y crecimiento celular continuos liberan pocas células junto con residuos metabólicos que favorecen la nueva colonización. Si las condiciones del flujo lo permiten, el equilibrio se establece entre el crecimiento de la colonia y el movimiento del agua, por lo cual el flujo libera algunas células. Si se presenta un flujo turbulento, se pueden desenganchar partes enteras de la biopelícula. Las células desprendidas aun podrían estar agrupadas y envueltas en EPS lo que facilitaría la colonización de nuevas superficies, para formar nuevas biopelículas (Arciola y Montanaro, 2018).

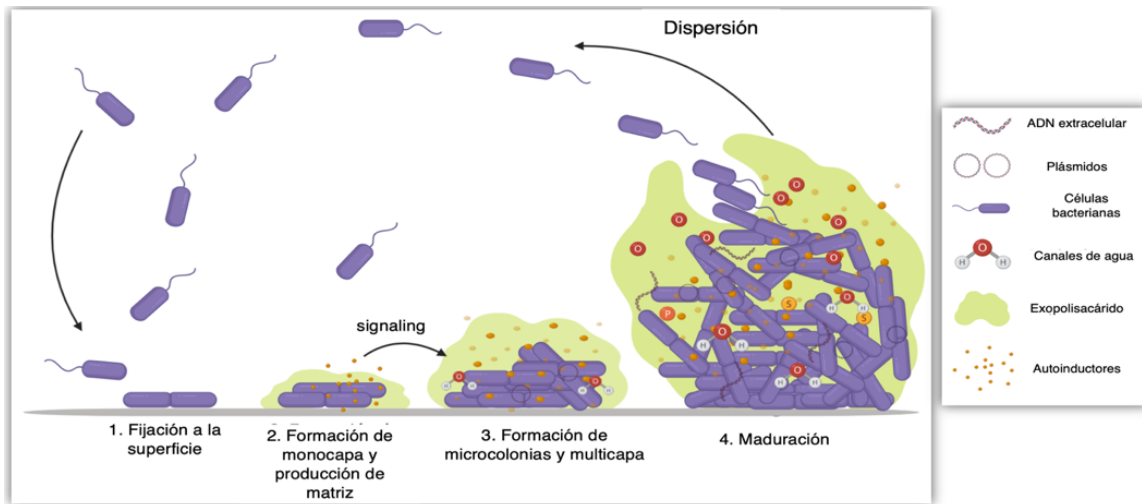


Figura 3. Proceso de formación de biopelículas

1.2.3 Farmacorresistencia de las biopelículas

La formación de biopelículas proporciona un medio para que los microorganismos, incluidos los patógenos resistentes y sensibles se protejan contra los antibióticos convencionales (Patel, 2005). Basado en evidencia de estudios recientes, la estructura compacta de las biopelículas hace que la comunidad microbiana presente propiedades para la supervivencia, que incluyen la conformación de interacciones físicas y químicas, cambios en las tasas de crecimiento bacteriano y morfología bacteriana alterada, entre otros (Mah *et al.*, 2001; Flemming *et al.*, 2016; Abebe *et al.*, 2020). Los principales mecanismos por los cuales las biopelículas sobreviven a la acción de los antibióticos convencionales se presentan a continuación:

- **Barrera de difusión del exopolisacárido:** La matriz de EPS secretada por las células bacterianas constituye una barrera para la penetración de agentes antimicrobianos. Lo anterior puede ser resultado de la arquitectura compleja del EPS maduro, la degradación antibiótica, quelación e inactivación de los antibióticos mediada por oxidación o la penetración lenta del

antibiótico según su composición química. Estos procesos reducen la efectividad de los antibióticos promoviendo la selección de células dentro de las biopelículas, las cuales podrán evadir el estrés antibiótico (Flemming *et al.*, 2016).

- **Transferencia horizontal de genes de resistencia:** El aumento de la densidad celular y la competencia genética constituyen un ambiente físico que favorece el contacto directo célula a célula y la acumulación de ADN extracelular. Lo anterior, mejora la transferencia de marcadores de resistencia antibiótica entre células mediante transferencia horizontal de genes (Hall and Mah, 2017). La conjugación bacteriana es el mecanismo más común de transferencia horizontal de genes, el cual ha sido documentado ampliamente en bacterias como *E. coli*, *S. entérica*, *P. putida*, *H. influenzae* y *V. cholerae*. La transferencia de genes entre las células presentes en la biopelícula podría generar la multiresistencia a antibióticos por los mecanismos convencionales de RAM. (Águila-Arcos *et al.*, 2017; Rendueles *et al.*, 2018; Bowler y Wolcott, 2020).

- **Velocidades específicas de crecimiento reducidas:** La limitación de nutrientes en las biopelículas conduce a una disminución de la velocidad específica de crecimiento, inanición bacteriana y un estado de latencia metabólica que contribuye a la tolerancia antimicrobiana (Stewart, 2015). Por otro lado, en las biopelículas, la actividad metabólica de las células decrece en la fase estacionaria, al disminuir su actividad metabólica aumenta significativamente su resistencia frente a los compuestos antimicrobianos (Hall y Mah, 2017; Miyaue *et al.*, 2018). Sumado a lo anterior, la velocidad específica de crecimiento lenta conduce a un estado de no esporulación, es decir, un estado Viable pero no Cultivable, conocido como VBNC (por sus siglas

en ingles); en el cual el organismo no puede crecer en los medios de cultivo enriquecidos y al mismo tiempo mantiene parámetros de viabilidad como la respiración, la presencia de ARNr y la integridad de la membrana plasmática (Singh *et al.*, 2017; Saxena *et al.*, 2019). Se ha documentado que en el estado VBNC, patógenos como *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *H. pylori*, *M. tuberculosis* y *H. influenzae* son resistentes a la acción de los antimicrobianos (Gu *et al.*, 2014).

- **Latencia fisiológica de células persistentes:** Las biopelículas contienen una pequeña fracción de la población bacteriana que exhibe una mayor tolerancia a biocidas y antimicrobianos, conocidas como “células persistentes”. Estas células sobreviven fácilmente a un ataque antibiótico al inducir alteraciones en el sitio diana del antibiótico (Miyaue *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2019). La tolerancia a múltiples fármacos en las células persistentes es un fenómeno fenotípico que permite una selección de mutantes que han adquirido resistencia. A medida que disminuye la presión antibiótica dentro de la biopelícula, las células persistentes dan lugar a una población bacteriana que es tan susceptible como la original. Por lo tanto, las células persistentes se han asociado con la persistencia de infecciones bacterianas relacionadas con la presencia de biopelículas *in vivo* (Wood, 2017).

- **Cambios en la morfología celular mediados por estrés:** Las células embebidas en las biopelículas enfrentan continuamente estrés debido a deficiencias nutricionales, modificación de pH y acumulación de sustancias tóxicas. Las bacterias tienen la capacidad innata de contrarrestar el estrés cambiando su morfología y fisiología celular, lo cual disminuye la sensibilidad frente a agentes antimicrobianos (Bhando *et al.*, 2019). La resistencia a los antibióticos en las biopelículas también está mediada por mecanismos genéticos que son específicos del fenotipo expresado en la

biopelícula, y por lo tanto se encuentran ausentes en las células planctónicas. La regulación genética de estos mecanismos depende de factores transcripcionales, los cuales, a su vez regulan la expresión de otros genes responsables de la tolerancia al estrés, y de reordenamientos fisiológicos y metabólicos (Jakubowski y Walkowiak, 2015; Lories *et al.*, 2020). Un ejemplo de estos mecanismos es la expresión de genes que codifican la enzima glucosiltransferasa, que cataliza la síntesis de glucanos cíclicos periplásmicos; estos glucanos promueven la resistencia bacteriana al secuestrar antibióticos en el periplasma, lejos de sus objetivos celulares (Jakubowski y Walkowiak, 2015).

- **Quorum sensing:** Como se mencionó anteriormente el QS es un sistema de comunicación bacteriana en el cual las bacterias regulan la expresión de ciertos genes en respuesta a los cambios en la densidad celular. Como resultado, se presentan diferentes modificaciones fenotípicas en las bacterias, entre las cuales se destacan la capacidad para formar biopelículas y la expresión de factores de virulencia (Jiang *et al.*, 2019; Pena *et al.*, 2019). El QS se ha asociado con el desarrollo adecuado de la arquitectura de la matriz de EPS, por lo que la deficiencia en el QS se correlaciona con una biopelícula estructuralmente delgada y con menor producción de EPS (Singh *et al.*, 2017).

1.3 Aceites Esenciales y Extractos Vegetales

Desde la antigüedad los EVs y AEs han sido usados contra enfermedades infecciosas debido a sus propiedades antimicrobianas. Se ha descrito que las plantas producen alrededor de 100.000 metabolitos secundarios que participan en la protección contra predadores y microorganismos patógenos y en mecanismos de protección contra estrés abiótico e interacciones con otros

organismos (Seow *et al.*, 2014; Nia *et al.*, 2016). El número de sustancias naturales con propiedades biológicas probadas aumenta constantemente y estas moléculas se clasifican en diferentes grupos químicos, entre los cuales podemos encontrar principalmente: polifenoles, terpenos, alcaloides y cumarinas (Nia *et al.*, 2016; Bouyahya, 2017). Los metabolitos secundarios como los terpenoides y los flavonoides son eficaces para combatir algunas bacterias patógenas, incluso si son usados en concentraciones bajas. Los EVs y AEs son fracciones que contienen las sustancias responsables de diferentes características fenotípicas de las plantas. Además, estos productos resultan importantes en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica, entre otras.

Los AEs y EVs están compuestos de mezclas complejas de hasta 100 compuestos que pueden ser alifáticos, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, entre otros. La composición química de los AEs extraídos de una misma especie vegetal puede ser variable y dependerá del área geográfica, hábitat, tiempo de cosecha, método de extracción y condiciones de almacenamiento (Rao y McClements, 2019). La actividad antimicrobiana de los EVs y AEs se encuentra principalmente en los terpenoides oxigenados, monoterpenos oxidados, alcoholes y terpenos fenólicos (Baczek *et al.*, 2017; Yagi *et al.*, 2016).

Numerosos estudios han demostrado que los AEs que contienen altos niveles de fenoles exhiben un amplio espectro de eficacia antimicrobiana (Costa *et al.*, 2019). Los AEs con mayor contenido de compuestos fenólicos son los terpenos; estos a su vez, forman clases estructurales y funcionalmente diferentes entre sí. La forma más común de los terpenos son los monoterpenos y se biosintetizan a partir del precursor Isopentenil Difosfato (IPP). La adición repetitiva de IPP para formar el precursor prenildifosfato de las diferentes clases de terpenos, y la modificación

enzimática secundaria del esqueleto terpénico, les atribuye sus propiedades funcionales. Los fenoles terpénicos constituyen un grupo de compuestos químicos, que consisten en un grupo hidroxilo (-OH) unido directamente a un anillo aromático. En algunos estudios se ha descrito, que la alta actividad biológica de los terpenos fenólicos está relacionada con la ubicación del grupo hidroxilo libre, el cual interactúa con compuestos hidrófobos de la membrana bacteriana, como los fosfolípidos. Los terpenos fenólicos más comúnmente encontrados en los AEs incluyen timol, eugenol y carvacrol, y se pueden encontrar en diferentes especies vegetales. En la **Figura 4**, se presentan sus estructuras químicas (Shojaee-Aliabadi *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2019; Tariq *et al.*, 2019).

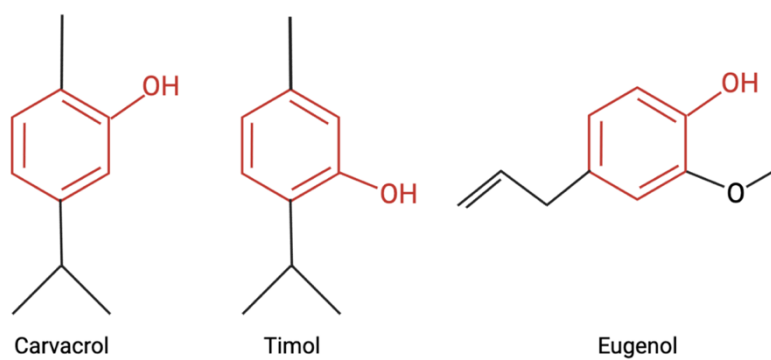


Figura 4. Estructura química de los principales monoterpenos fenólicos.

1.3.1 Actividad biológica de los aceites esenciales

Los AE presentan una bioactividad que corresponde a la actividad de cada uno de sus componentes principales. Sin embargo, se ha demostrado que los componentes minoritarios podrían estar ejerciendo una actividad sinérgica o aditiva (Cava-Roda *et al.*, 2021). Algunos autores han determinado que los metabolitos con composición química derivada de fenoles, cetonas, aldehídos,

alcoholes, ésteres e hidrocarburos tienen altas actividades antimicrobianas individualmente, por lo cual, la actividad exhibida en los aceites esenciales, resultará de las interacciones complejas entre las diferentes clases de metabolitos presentes (Nazzaro *et al.*, 2017; Chouhan *et al.*, 2017). La interacción entre los metabolitos presentes en los AEs puede ser indiferente, aditivo, antagonista y sinérgico (Tariq *et al.*, 2019).

Debido a la gran cantidad de componentes que contienen, los AEs tienen diferentes objetivos diana en los microorganismos. Los AEs como sustancias lipofílicas pueden atravesar la pared celular y la membrana citoplasmática, alteran la estructura de los diferentes polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos para permeabilizarlos, la citotoxicidad incluiría la desnaturalización de la membrana (Man, 2019). En las bacterias, la permeabilización de la membrana se asocia con la pérdida de iones y la reducción del potencial de membrana, colapso de la bomba de protones, agotamiento de la reserva de ATP, coagulación del citoplasma y daño de proteínas y lípidos estructurales y fuga de macromoléculas para finalmente provocar una lisis celular (Nazzaro *et al.*, 2017). En estudios SEM recientes (Diniz do Nascimento *et al.*, 2020), se ha evidenciado la alteración ultraestructural de la bacteria, observándose modificaciones como hinchazón, encogimiento, vacuolaciones o fugas en la membrana plasmática, el citoplasma y el núcleo. En otras investigaciones, los análisis de los perfiles lipídicos mediante cromatografía de gases y de la estructura de la envoltura celular analizada a través de bacterias tratadas con AEs mostraron una fuerte disminución en la concentración de ácidos grasos insaturados y aumento de los saturados, por lo cual una alteración considerable de la envoltura celular. Hasta el momento, la actividad biológica de los aceites esenciales se podría clasificar en citotoxicidad, fitotoxicidad, mutagenicidad nuclear, citotoxicidad citoplasmática, carcinogenicidad y propiedades antimutagénicas y antioxidantes (Nazzaro *et al.*,

2017; Diniz do Nascimento *et al.*, 2020). El efecto biológico de los aceites esenciales sobre vías de señalización celular y regulación molecular aún no ha sido completamente dilucidado.

1.4 Transcriptómica

Es el conjunto de técnicas que se utilizan para el estudio del transcriptoma, es decir de la totalidad de moléculas de ARN en una célula, en un determinado momento y bajo condiciones específicas. El contenido informativo de un organismo se registra en el ADN de su genoma y se expresa mediante la transcripción. En este caso, el ARNm sirve de molécula intermediaria transitoria en la red de información, mientras que los ARN no codificantes desempeñan otras funciones diversas. Un transcriptoma capta una imagen instantánea en el tiempo del total de transcripciones presentes en una célula (Haider y Pal, 2013).

El ARN es una molécula que está presente en la mayoría de los organismos vivos y en los virus. Está formado por nucleótidos, que son azúcares de ribosa unidos a bases nitrogenadas y grupos fosfato. Las bases nitrogenadas incluyen adenina, guanina, uracilo y citosina. El ARN existe principalmente en forma monocatenaria, pero hay virus de ARN especiales que son bicatenarios. La molécula de ARN puede tener diversas longitudes y estructuras. La función principal del ARN es crear proteínas mediante la traducción (Lowe *et al.*, 2017). El ARN transporta información genética que es traducida por los ribosomas en diversas proteínas necesarias para los procesos celulares. El ARNm, el ARNr y el ARNt son los tres tipos principales de ARN que participan en la síntesis de proteínas. El ARN también sirve como material genético primario para los virus. Otras funciones son la edición del ARN, la regulación de los genes y la interferencia del ARN.

Estos procesos son llevados a cabo por un grupo de pequeños ARN reguladores, entre los que se encuentran los pequeños ARN nucleares, los microARN y los pequeños ARN de interferencia (Kallisky *et al.*, 2018; Ramanathan *et al.*, 2019).

Una de las herramientas comúnmente utilizada en transcriptómica es la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa reversa en Tiempo Real (RT-qPCR), la cual es usada para evaluar la expresión de genes específicos regulados en una condición controlada (Tian *et al.*, 2012). La RT-qPCR es una variante de la PCR convencional, que permite detectar, amplificar y cuantificar en tiempo real secuencias de ARN o ADN; es decir, permite determinar la cantidad de fragmentos moleculares que se van produciendo en el tiempo.

El conjunto de datos transcriptómicos obtenidos a partir de diferentes estudios ha permitido asociar los 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. Así mismo, se han descrito otros mecanismos relacionados con la regulación positiva o negativa en la expresión de genes involucrados en la comunicación mediada por QS y la formación de biopelículas, frente al efecto ocasionado por la lisozima o la combinación de resveratrol con vancomicina, y otras diversas combinaciones terapéuticas (Qin *et al.*, 2014; Vollmer *et al.*, 2018). La variación de los perfiles de expresión génica en la activación de los mecanismos de RA, la regulación del sistema QS y la formación de biopelículas junto con otras características de expresión de virulencia pueden ser estudiadas mediante el nivel de expresión de ARNm, debido a que el ARNm constituye un buen

indicador del estado fisiológico de una célula y de la regulación genética que realiza la bacteria como mecanismo de supervivencia frente a condiciones adversas (Becker *et al.*, 2011).

La aplicación de la RT-qPCR permite determinar las variaciones en el perfil de resistencia antimicrobiano, junto a los cambios genéticos que podrían presentarse bajo diferentes situaciones de estrés en la célula. De esta manera podrían relacionarse los perfiles de variación en la expresión de genes específicos con posibles mecanismos de acción de los AE, sobre la RAM, el sistema QS y la formación de biopelículas. Además, de poder establecer posibles biomarcadores y dianas terapéuticas para la generación de nuevos compuestos antimicrobianos con base en los AE (Khaledi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

2. Estado del Arte

2.1 AE como agentes antimicrobianos

La acción antibacteriana de los AE comprende numerosos objetivos celulares: la membrana, la pared, la cadena respiratoria y efecto en los sistemas de comunicación QS y formación de biopelículas (Truchado *et al.*, 2015; Bouyahya *et al.*, 2017). En la **Tabla 1**, se presenta una revisión bibliográfica de actividad biológica de diferentes AE sobre diferentes microorganismos. Hasta el momento, se ha demostrado que numerosas moléculas presentes en los AE pueden inhibir los mediadores del QS y la formación de biopelículas mediante diferentes mecanismos (Sharma *et al.*, 2021). Entre los más estudiados se incluyen: inhibición de síntesis de autoinductores, inhibición del transporte o secreción de autoinductores, separación por competencia de autoinductores, inhibición del receptor de autoinductores, secuestro de moléculas señal de adhesión, interferencia

de la producción de EPS, degradación de moléculas precursoras de biopelículas y regulación transcripcional negativa. Algunos EVs y AEs pueden actuar como inhibidores del QS debido a la similitud de los compuestos que los conforman, con las moléculas señalizadoras del sistema QS o a la capacidad de degradar los receptores de señalización y/o reguladores transcripcionales (Al-hussaini y Mahasneh, 2009; Calo *et al.*, 2015; Truchado *et al.*, 2015). En la **Tabla 2** se evidencia la actividad potenciada de AEs con mayor contenido de monoterpenos fenólicos.

Tabla 1. Revisión Bibliográfica de actividad biológica de diferentes AE sobre diferentes microorganismos

Especie de planta	Componentes mayoritarios	Microorganismo evaluado	Referencia
<i>Artimisia cana</i>	Santolina trieno, α pineno, campeno	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Lutz <i>et al.</i> , 2008
<i>Artimisia frígida</i>	1,8-cineol, metilcavicol, campor	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	Lutz <i>et al.</i> , 2008
<i>Cymbopogon citrus</i>	Compuestos etanólicos	<i>S. aureus</i> , Enterobacteriaceae	Grohs y Kunz <i>et al.</i> , 2000
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Timol, eugenol, carvacrol, cinnamaldehído	<i>S. epidermidis</i>	Dos santos <i>et al.</i> , 2015
<i>Foeniculum vulgare</i>	Limoneno, metilcavicol, Trans-antole	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium	Bisht <i>et al.</i> , 2014
<i>Mentha piperita</i>	ND	<i>S. Typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Sokovic <i>et al.</i> , 2009
<i>Momordica Charantia</i>	Germacreno D, Trans nerolidol, cis-dihidrocarvacol	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Bracca <i>et al.</i> , 2008
<i>Lippia sidoides</i>	Carvacrol, timol	<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus sanguis</i>	Botelho <i>et al.</i> , 2007

		<i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus mutans</i>	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Linalol, borneol, limoneno, campeno, mircene, campor, geraniol, α -pineno, bornil acetato, α -terpinoleon, linalol benzonilacetato	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Strongylus vulgaris</i>	Fu <i>et al.</i> , 2007; Oussalah <i>et al.</i> , 2006
<i>Salvia officinalis</i>	1,8-cineol, campor, α -pineno, α -tijuno	<i>E. coli</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>M. flavus</i> , <i>L. innocua</i> ,	Bohme <i>et al.</i> , 2014; Jirovetz <i>et al.</i> , 2007
<i>Salvia lavandulifolia</i>	Campeno, terpineol, α -pineno, α -tujone, campor, β -tujone	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Jirovetz <i>et al.</i> , 2006
<i>Thymus zygis</i>	ND	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i>	Renalver <i>et al.</i> , 2005
<i>Warionia saharae</i>	Terpino-4-ol, p-cymeno, trans-nerolidol, campor, 1,8-cineol, linalol, β -Eudesmol	<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Sellam <i>et al.</i> , 2014
<i>Lippia origanoides</i>	Timol, Carvacrol	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>E. coli</i> O33, <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> , SARM	Cáceres <i>et al.</i> , 2020 Gomez-Sequeda <i>et al.</i> , 2020

Tabla 2. Antecedentes del efecto AE con mayor contenido de fenoles frente a diferentes bacterias.

Planta	Componente mayoritario	Microorganismo	Efecto antimicrobiano	Referencia
Orégano	Carvacrol, p-cymeno, thymol, γ -terpineno	<i>S. aureus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>S. Enteritidis</i>	Alta inhibición antimicrobiana	Oliveira <i>et al</i> 2007; Govaris <i>et al</i> 2010
Tomillo	Carvacrol, linalool, thymol	<i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Enterobacter</i> spp., <i>Listeria</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.	Bajas concentraciones de MIC y alta inhibición antimicrobiana en bajas	Burt and Reinders 2003; Mytle <i>et al</i> 2006; Gutierrez <i>et al</i> 2008;

			concentraciones de AE	
Romero	1,8-cineole, limoneno, linalool oxidado, α -pineno carvacrol	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Alta inhibición antimicrobiana en bajas concentraciones de AE	Pintore <i>et al</i> 2002; Jiang <i>et al</i> 2011
<i>Lippia origanoides</i> HBK	Carvacrol, timol γ -Terpineno, <i>p</i> -cimeno, <i>trans</i> - β -cariofileno.	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteritidis</i>	Alta actividad antimicrobiana en bajas concentraciones de AE	Dos santos 2004; Dos santos 2007; Alves <i>et al.</i> 2019;

Recientemente se han desarrollado múltiples estudios enfocados en productos derivados de plantas medicinales para identificar nuevos agentes antimicrobianos con baja citotoxicidad, con efecto inhibitor del QS y de la formación de biopelículas y baja capacidad para el desarrollo de resistencia bacteriana. En la **Tabla 3** se presenta una revisión bibliográfica sobre este tema. Sin embargo, los mecanismos de acción anti-QS y antibiopelícula de los EVs y AEs aún no han sido completamente elucidados y es probable que la eficacia antimicrobiana esté relacionada con las redes de regulación transcripcional (Omonijo *et al.* 2018).

Tabla 3. Revisión bibliográfica de actividad antibiopelícula y antiQS de diferentes AE sobre *E. coli* y *S. aureus*

Especie de plantas	Productos	Componente mayoritario	Microorganismo Evaluado	Efecto biológico	Bibliografía
<i>Pityrocarpa moniliformis</i>	Extracto vegetal	ND	<i>S. aureus</i>	Inhibición de los factores QS involucrados en la formación de biopelículas	Khalil <i>et al.</i> 2018; Artini <i>et al.</i> 2018
<i>Citrus reticulata</i>	Aceite esencial	Limoneno	<i>E. coli</i>	Inhibición de las moléculas involucradas en la adhesión y en la maduración	Khorshidian <i>et al</i> 2018; Qiu <i>et al.</i> 2010; Millezi <i>et al.</i> 2013

				de las biopelículas	
<i>Thymus vulgaris</i>	Aceite esencial	Carvacrol, Timol	<i>S. aureus</i>	Disminución en la formación de biopelículas	Rao <i>et al.</i> , 2018; Gedikoğlu <i>et al.</i> , 2019; Swamy <i>et al.</i> , 2015
<i>Psoralea corylifolia</i>	Extracto vegetal	ND	<i>E. coli</i>	Inhibición en la formación de biopelículas	Mittal <i>et al.</i> 2019; Do <i>et al.</i> 2015
<i>Lippia organoides</i>	Aceite esencial	Timol, carvacrol	<i>S. aureus; E. coli</i>	Alteración de los ácidos grasos en la membrana, disminución en la producción de exopolisacarido	Hood JR, <i>et al.</i> , 2003; Oliveira., <i>et al.</i> , 2007
<i>Lippia organoides</i>	Aceite esencial	Timol, carvacrol	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>E. coli</i> O33, <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> , SARM	Inhibición de la formación de biopelículas, inhibición de pigmentos, inhibición del QS	Cáceres <i>et al.</i> , 2020 Gomez-Sequeda <i>et al.</i> , 2020

Cada vez son más las investigaciones que se enfocan en la identificación de nuevos agentes terapéuticos y anti-patogénicos que podrían actuar como inhibidores de la formación de la biopelícula y del sistema QS en bacterias resistentes y multirresistentes. Hasta el momento se han descrito algunos posibles mecanismos por medio de los cuales estos compuestos podrían inhibir el QS, tales como la inhibición de síntesis de autoinductores, inhibición de proteínas receptoras o transportadoras y la degradación de autoinductores (**Figura 5**) (Nascimento *et al.* 2000; Jafri *et al.* 2019). Así mismo, durante los últimos años se ha hecho énfasis en el uso de herramientas ómicas para determinar el efecto de los AE sobre rutas metabólicas, regulación transcripcional y el efecto en la expresión de genes relacionados con la formación y maduración de la biopelícula, comunicación QS y resistencia antimicrobiana. Sin embargo, se hace necesario realizar estudios relacionados con el efecto de la exposición del microorganismo frente a los AEs, sobre la expresión

de genes. De esta forma se busca determinar un posible mecanismo de acción del AE sobre las redes de regulación transcripómicas de la formación de biopelículas y la comunicación bacteriana.

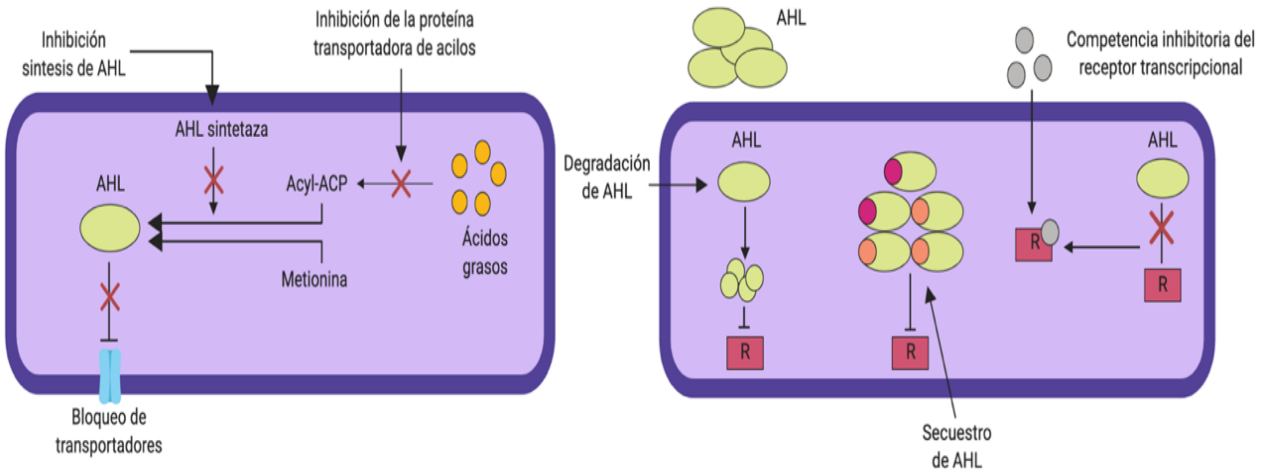


Figura 5. Esquema general del posible efecto de los AE sobre el sistema QS

2.2 Genes implicados en la formación de biopelículas y el sistema QS en *S. aureus* y *E. coli*

Como se mencionó anteriormente la formación de biopelículas en un estado en el que los microorganismos pueden protegerse frente a diferentes condiciones desfavorables en el entorno. El sistema QS y la formación de biopelículas dependerán de la expresión de genes específicos, involucrados en redes complejas de regulación que las bacterias expresarán de acuerdo en respuesta a determinados estímulos del entorno. En las **Tablas 4** y **5** se presentan los principales genes relacionados con la formación, maduración y supervivencia de las biopelículas, genes reguladores del sistema de comunicación QS, genes asociados a la supervivencia frente al estrés, la producción de toxinas y la patogenicidad en *S. aureus* y *E. coli*.

Tabla 4. Genes implicados en la regulación del sistema QS y la formación de biopelículas de *S. aureus*

Genes	Ruta involucrada	Bibliografía
<i>clpB, clpC</i>	Tolerancia al estrés Replicación intracelular Formación de biopelículas	Gunaratnam <i>et al.</i> , 2019; Alam <i>et al.</i> , 2021
<i>adrD, Fib, isdB, srtB, ebh, sdrC</i>	Producción de adhesinas, formación y remoción de las biopelículas	Askarian <i>et al.</i> , 2017; Ajayi, 2018
<i>ClfA</i>	Factor de aglutinación A (antígeno protector y determinante de virulencia)	Farnsworth <i>et al.</i> , 2017; Claes <i>et al.</i> , 2017
<i>vraF, vraG, diT, Aur</i>	Producción de proteínas con actividad de resistencia antimicrobiana	Vestergaard <i>et al.</i> , 2017; Gimza <i>et al.</i> , 2021
<i>PBP2a</i> , operon <i>icaABDC</i>	Síntesis de peptidoglicano y resistencia a betalactámicos (MRSA), síntesis de EPS	Liu <i>et al.</i> , 2018; Ozdemir y Eken, 2021
<i>hla</i>	Alfa hemolisina regulada directamente por el sistema QS (<i>agr</i>)	Jaddoa y Al-Marhkhury, 2018; Paulander <i>et al.</i> , 2018
<i>rsbu</i>	Proteína reguladora del factor B-sigma, factor de transcripción inducido por estrés que altera la producción de adhesinas	Zhang y Nair, 2018; Fischer <i>et al.</i> , 2019
<i>hld</i>	Toxinas y Resistencia a antibióticos	Guo <i>et al.</i> , 2019; Alkhafaji y Alsaimary, 2020
<i>spA</i>	Proteína estafilococcica A (proteína de superficie capaz de reconocer anticuerpos e inhibir su acción)	Goudarazi <i>et al.</i> , 2017; Yunita <i>et al.</i> , 2020
<i>Cap5G, cap5F, cap5B, cap5C, cap5A, cap5D, cap5M</i>	Proteínas de síntesis de polisacáridos capsulares	Mohamed <i>et al.</i> , 2019; Li <i>et al.</i> , 2018
<i>arcA, arcB, Aur, CarA, CarB</i>	Metabolismo y supervivencia las biopelículas	Lekshmi <i>et al.</i> , 2018; Wu <i>et al.</i> , 2019
<i>agrA, agrB, agrC, agrD, hed, SarA</i>	Sistema de comunicación QS	Tan <i>et al.</i> , 2018; Villiammai <i>et al.</i> , 2020
<i>sek, efb</i>	Proteínas de superficie y de secreción	Liang <i>et al.</i> , 2017; Gimza <i>et al.</i> , 2021
<i>ccpA</i>	Proteína reguladora de metabolitos de carbono, RNAIII y exotoxinas	Reed <i>et al.</i> , 2018; Patzold <i>et al.</i> , 2021

Tabla 5. Genes implicados en la regulación del sistema QS y la formación biopelículas en *E. coli*

Genes	Ruta involucrada	Bibliografía
<i>SdiA</i>	Sistema de comunicación QS, homólogo LuxR	Lu <i>et al.</i> , 2017; Culler <i>et al.</i> , 2018
<i>LuxS</i>	Sistema de comunicación QS, sistema principal	Zuberi y Khan <i>et al.</i> , 2017; Amandeep y Sharma, 2020
<i>Sep, esc, eae, EspA, EspB, Tir, Ler</i>	Genes involucrados en la colonización, regulados por el QS	Sharma <i>et al.</i> , 2016; Lin <i>et al.</i> , 2017; Zheng <i>et al.</i> , 2021
<i>gabT, astD, tna</i>	Metabolismo de aminoácidos	Yu <i>et al.</i> , 2019; Sungh <i>et al.</i> , 2020
<i>QseE, QseC, QseF</i>	Vía de AI-3, epinefrina, norepinefrina	Machado <i>et al.</i> , 2019; Wu <i>et al.</i> , 2021
<i>motA</i>	Flagelos y motilidad	Ravichandar <i>et al.</i> , 2017; Yip <i>et al.</i> , 2019
<i>AriR</i>	Formación y estructura de las biopelículas	Sharma <i>et al.</i> , 2016; Lin y Chen, 2018
<i>QscBC, flhCD, pgaC</i>	Formación de biopelículas	Beloin <i>et al.</i> , 2008; Borges y Simoes (2012)
<i>MqsR, McbR, McbA</i>	Formación de biopelículas	Sun <i>et al.</i> , 2017; Fraikin <i>et al.</i> , 2019
<i>Hha, TomB</i>	Formación de biopelículas	Barrios <i>et al.</i> , 2006; Anunthawan <i>et al.</i> , 2015
<i>Stx</i>	Producción de toxinas	Senthakumaran <i>et al.</i> , 2018; Byrne y Jenkins, 2020
<i>Csga, CsgD</i>	Unidad mayor curli, formación de biopelículas	Andersson <i>et al.</i> , 2013; Ogasawara <i>et al.</i> , 2020
<i>rpoS</i>	Respuesta al estrés y cambios de pH	Evans y Ling, 2019; Schellhorn, 2020
<i>fimH, CsrA</i>	Motilidad y adhesión a superficies	Zhang <i>et al.</i> , 2020; Renda <i>et al.</i> , 2020

2.3 Análisis de expresión génica

Como se mencionó anteriormente, el estudio del transcriptoma permite identificar los genes que son regulados en un momento determinado de tiempo y bajo diferentes condiciones. Además permite determinar el 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). El conjunto de datos obtenidos por medio de

estudios transcriptómicos ha permitido relacionar el nivel y los perfiles de expresión génica involucrados en la adherencia a superficies, factores de virulencia, patogénesis, rutas metabólicas energéticas y mecanismos de comunicación celular, con el efecto producido por diferentes agentes antimicrobianos. Por ejemplo, inhibición de la formación de biopelículas y comunicación mediada QS ocasionada por el tratamiento con lisozima o la combinación de resveratrol con vancomicina (Qin *et al.*, 2014; Grimm *et al.*, 2018). Mediante la herramienta molecular RT-qPCR diferentes autores han podido dirigir los estudios hacia la demostración de la regulación positiva y negativa de genes específicos que están relacionados con la patogenicidad, la virulencia, la formación de biopelículas, el sistema QS, la respuesta al estrés oxidativo y la respuesta de diferentes bacterias patógenas a la acción de agentes antimicrobianos, incluidos los derivados de plantas. En la **Tabla 6**, se presenta una revisión bibliográfica.

Es de resaltar que el efecto de los AEs sobre la expresión de genes dependerá del microorganismo evaluado, la concentración del AE y las condiciones de crecimiento evaluadas. El uso de la RT-qPCR, permiten dirigir la investigación hacia genes específicos, cuya expresión se regulará positiva o negativamente por efecto de compuestos antimicrobianos. Los estudios sobre el ARN bacteriano, 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; en este sentido, la ventaja de realizar estudios transcriptómicos, es el permitir 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.

Tabla 6. Revisión bibliográfica del efecto transcriptómico de diferentes AE sobre bacterias patógenas

Material Vegetal	Componentes mayoritarios	Microorganismo evaluado	Genes inducidos	Ruta transcripcional afectada	Bibliografía
<i>Piper nigrum</i>	limoneno, beta-cariofileno	<i>P. psychrophila</i>	<i>lasR, rhlR, traR, pqsR, muxB, mexB</i> y <i>mfs</i>	<i>Quorum sensing</i> Bombas de flujo	Tomas <i>et al.</i> , 2021
<i>Origanum heracleoticum</i>	carvacrol, timol, p-cimeno, beta-cariofileno, γ -terpineno	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>luxS, fliC, ler, Stx2B</i>	<i>Quorum sensing</i> , motilidad, virulencia	Mith <i>et al.</i> , 2015
<i>Zingiber officinale</i>	γ -terpineno, isoborneol, citral	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>aflR, aflS, yap, aflC, aflG</i>	Producción de aflatoxina	Moon <i>et al.</i> , 2018
<i>Cymbopogon citratus</i>	Geranial, neral, limoneno, geraniol, linalool, geranil acetato	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly, inlJ, acpP, plcA, plcB, inlB, inlC, lmo2470</i>	Virulencia, biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis de peptidoglicano	Hadjilouka <i>et al.</i> , 2017
<i>Thymus kotschanus</i>	carvacrol, timol, gamma-terpineno	<i>Candida albicans</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida glabrata</i>	<i>als</i> genes	Resistencia a antibióticos y patogenicidad	Muslim y Hussin <i>et al.</i> , 2020
<i>Dracocephalum polychaetum</i>	ND	<i>S. aureus</i> (SARM)	<i>icaA, icaD sar, bap,</i>	Producción de EPS, formación de biopelículas	Yaghoobi <i>et al.</i> , 2018
<i>Elettaria cardamomum</i>	Sabineno, alfa-terpineno, beta-pineno	SARM	<i>icaABDC icaR SarA sigB</i>	Actividad metabólica bacteriana, Producción de EPS, formación de biopelículas	Cui <i>et al.</i> , 2020
<i>Malaleuca bracteata</i>	Geranial, neral, limoneno, geraniol, linalool, geranil	<i>S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, S. marcescens, C. violaceum</i>	<i>cviI, cviR, vioABCDE, hms nR, lasA-B, pilE1, pilE3, y hcnB</i>	<i>Quorum sensing</i> , Patogenicidad y virulencia	Wang <i>et al.</i> , 2019

3. Planteamiento del problema

Las infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos convencionales constituyen hoy en día una de las causas más importantes de muerte en el mundo. Estas infecciones pueden ser consideradas enfermedades emergentes debido al gran potencial que tienen de afectar al ser humano y a las limitaciones de los tratamientos terapéuticos con que se cuenta para combatirlos a nivel mundial (Gales, 2012; Rocha, 2015). La RAM incluye resistencia a compuestos farmacéuticos usados para tratar diferentes tipos de microorganismos, entre los que se incluyen las bacterias. Cabe resaltar que la RAM puede aparecer generalmente por modificación genética, mutaciones o mecanismos de transferencia de resistencia entre comunidades de bacterias; además, la RAM se ve acelerada en gran medida por el uso inadecuado o excesivo de los antibióticos convencionales, debido al contacto constante del antibiótico con la bacteria, permitiendo una adaptación rápida de esta (Abdellatif *et al.*, 2018; Brogan y Mossialos, 2016).

Los géneros bacterianos resistentes y multirresistentes a los antibióticos, se han clasificado según la prioridad de generar alternativas para ser combatidos. En esta clasificación realizada por la OMS se encuentran *S. aureus* en prioridad elevada y *E. coli* en prioridad crítica (OMS, 2019). *Escherichia coli* constituye uno de los microorganismos colonizadores del tracto gastrointestinal humano, aunque solo representa el 0,1% del microbioma intestinal. Esta bacteria ha sido descrita como comensal, pero también se ha demostrado su contribución en la digestión y producción de vitaminas del sistema digestivo humano. Por otra parte, *E. coli* también es considerado uno de los patógenos más importantes siendo el agente causal de diversas enfermedades intestinales y extraintestinales. Las cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos se aíslan con mucha más

frecuencia a partir de muestras de orina en pacientes con infecciones en el tracto urinario, infección cuya cronicidad y recurrencia está relacionada con la formación de biopelículas (Abdellatif *et al.*, 2018; Brogan y Mossialos, 2016).

Durante los últimos años, se ha evidenciado un incremento mundial del 40% en la resistencia de *E. coli* frente a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas (Poirel *et al.*, 2018). En el 2016 el Instituto Nacional de Salud (INS) declaró una alerta debida a la aparición del gen de resistencia a la Colistina en aislamientos de *E. coli* y *Salmonella* Enteritidis. Cabe mencionar que este es un antibiótico de uso contra bacterias Gram negativas multirresistentes (INS, 2016; INS, 2018). En un estudio se determinó que la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) causada por *E. coli*, es la segunda causa de morbilidad en Colombia, con una tasa de mortalidad infantil total de 4% (Hernandez-Gómez *et al.*, 2014; Maldonado *et al.* 2014). Sumado a lo anterior, Ortiz-Mateus y col., identificaron genes de resistencia en cepas comensales de *E. coli* en niños menores de 5 años en el área metropolitana de Bucaramanga (Ortíz-Mateus *et al.*, 2020). Por lo tanto, *E. coli* representa un problema importante de salud pública nacional y mundial.

Por otra parte, *Staphylococcus aureus* es una bacteria que puede presentarse como huésped de diferentes partes del cuerpo humano como la piel, glándulas de la piel y las membranas mucosas. Sin embargo, *S. aureus* representa un patógeno muy común en el desarrollo de infecciones en el ser humano. *S. aureus* tiene la capacidad de adaptarse a diversas condiciones desfavorables, debido a que cuenta con un amplio repertorio de factores de virulencia y toxinas que le permiten sobrevivir al ataque del sistema inmunitario humano y causar un amplio rango de infecciones, principalmente infecciones asociadas a la atención en salud. *S. aureus* se asocia a infecciones recurrentes y

persistentes debido a puede formar biopelículas en todo tipo de superficies, principalmente en superficies poliméricas como en los dispositivos médicos e implantes (Lee *et al.*, 2018). La formación de biopelículas por *S. aureus* favorece la resistencia frente al sistema inmune del hospedero y al efecto de los antibióticos convencionales (McCarthy *et al.*, 2015; Jamali *et al.* 2015; Lee *et al.*, 2018).

En América, el 95% de las infecciones ocasionadas por *S. aureus* son resistentes a Meticilina; mientras que en Asia y Europa son del 25% y 45% respectivamente. Estos porcentajes confirman la baja efectividad del tratamiento con antibióticos habituales como Meticilina y Vancomicina (OPS, 2014; OMS, 2019). La resistencia de *S. aureus* a la Meticilina oscila entre el 65% y 75% en cuidados intensivos y entre el 50% y 75% en servicios de atención en salud diferentes a cuidados intensivos (OPS, 2017; Pave *et al.*, 2015). También se ha reportado que para infecciones de vías urinarias no es una buena opción el uso de fluoroquinolonas ya que presentan resistencia en el 35% de los casos. En Colombia, se ha documentado un incremento de cepas resistentes y multirresistentes de *S. aureus* y *S. epidermidis* en bacteriemias, osteomielitis e infecciones asociadas a la atención en salud de un 60% desde el 2010 (Orozco *et al.*, 2018).

Por otro lado, la RAM en infecciones causadas por especies bacterianas como *E. coli* y *S. aureus* se ve favorecida por la formación de biopelículas. Las bacterias formadoras de biopelículas producen una matriz compacta y protectora, que les permite la adherencia a superficies tales como dispositivos médicos y tejidos. El crecimiento de bacterias patógenas en forma de biopelícula contribuye a la cronicidad de las infecciones y a su recurrencia, especialmente a las asociadas a dispositivos médicos e implantes (Olsen, 2015; Hall *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017).

En general, las bacterias en estado sésil o de biopelícula, persisten en el hospedero mediante una estrategia de supervivencia extraordinaria que no necesariamente se traduce en una virulencia agresiva. Diversos estudios han demostrado la resistencia de las biopelículas a tratamientos con antibióticos, con concentraciones de cientos e incluso 100 mil veces la concentración mínima inhibitoria (Stewart *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2017). Las biopelículas comparten propiedades únicas en comparación a las células planctónicas, incluida mayor tolerancia a los antibióticos convencionales y terapias antimicrobianas combinadas. En las biopelículas pueden presentarse mecanismos que favorecen la resistencia a antibióticos que incluyen: penetración lenta o incompleta del antibiótico, alteración de microambientes, acumulación local de desechos ácidos, diferenciación en un estado fenotípico altamente protegido, disminución del metabolismo celular, sobreproducción de enzimas degradadoras e integración de sistemas de comunicación celular como el QS (Sagar *et al.*, 2016; Simmons *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2019). Las redes de regulación metabólica del QS están involucradas en el comportamiento comunitario de las bacterias. Además, por medio de las rutas de señalización del QS las bacterias pueden regular características asociadas a la patogenicidad, como la expresión de factores de virulencia y una mejora de los mecanismos de acción frente a los antibióticos convencionales.

Por su parte, las redes de regulación metabólica del QS están involucradas en el comportamiento comunitario de las bacterias. Además, por medio de las rutas de señalización del QS las bacterias pueden regular características asociadas a la patogenicidad, como la expresión de factores de virulencia y una mejora de los mecanismos de acción frente a los antibióticos convencionales. Por lo anterior, las redes de regulación QS y la formación de biopelículas favorecen una mayor

competencia genética; lo que se traduce en una mayor RAM y adaptabilidad de las bacterias a los diferentes tratamientos disponibles (Bhaat, 2018; Paramanantham *et al.*, 2018).

Ante la ineffectividad de los tratamientos actuales contra la RAM favorecida por la formación de biopelículas surge la necesidad de encontrar alternativas antimicrobianas que promuevan la inhibición de diversas rutas relacionadas con los sistemas de comunicación celular y la formación de biopelículas. En este sentido, han surgido diferentes antimicrobianos dentro de los cuales resaltan los compuestos derivados de plantas como los AE y EV. En el caso de los AE se ha evidenciado su actividad inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano, la formación de biopelículas, *quorum sensing* y diferentes características bacterianas relacionadas con la patogenicidad y virulencia (Truchado *et al.*, 2015; Omonijo *et al.* 2018).

Recientemente, se han encontrado AE derivados de plantas aromáticas colombianas capaces inhibir o eliminar bacterias patógenas y resistentes a antibióticos. Además, se ha evidenciado que algunos de estos compuestos son capaces de inhibir el sistema *quorum sensing* y la formación de biopelículas de los microorganismos evaluados en concentraciones sub-inhedoras (Cáceres *et al.*, 2020; Gomez-Sequeda *et al.*, 2020). De los AE mencionados anteriormente se destaca el AE de *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II (LOTC II), que fue el AE con mayor efecto antibacteriano, antibiopelícula y antiQS en concentraciones sub-inhedoras y que además demostró tener baja toxicidad frente a una línea celular Vero (Cáceres *et al.*, 2020).

A pesar del potencial terapéutico de amplio espectro de acción frente a enfermedades infecciosas de los AE, hasta el momento son escasos los estudios que se centran en la búsqueda de sus posibles mecanismos de acción. Actualmente, mediante diferentes herramientas transcriptómicas como

RNA-seq y RT-qPCR algunos investigadores han demostrado el efecto de diferentes AEs y EVs sobre rutas asociadas al sistema QS, la formación de biopelículas y diferentes características de virulencia bacteriana (**Tabla 5**). Debido a que *Lippia origanoides* es una planta endémica de algunos países de Latinoamérica, no hay información relacionada a sus efectos moleculares, ni sobre un posible mecanismo de acción sobre los microorganismos involucrados en esta propuesta.

Por todo lo comentado anteriormente, se hace necesario evaluar el efecto del AE de LOTC II sobre el genoma bacteriano, específicamente sobre los transcritos que se regulan positivamente o negativamente por efecto del AE y que están involucrados en el sistema QS y la formación de biopelículas. Además, los resultados obtenidos mediante esta investigación se podrían complementar con otras herramientas moleculares, lo que permitiría establecer posibles dianas terapéuticas u objetivos bacterianos diferentes a los que utilizando los antibióticos convencionales, contrarrestando la capacidad de las bacterias de adaptarse al tratamiento. O de otra forma podría pensarse en el uso de tratamientos combinados. Cabe mencionar que en el marco de ejecución del proyecto macro en el cual se anida este proyecto (Colciencias-1102-777-57586; proyecto UIS-8742), se realizaron los estudios para seleccionar el mejor AE. De esta forma el presente estudio se realizó con el AE de LOTC II, el cual fue seleccionado por sus propiedades antimicrobianas.

4. Pregunta de Investigación

¿Cuáles son los posibles mecanismos de acción del AE *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II sobre el QS y la formación de biopelículas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* 29213, que pueden ser identificados mediante el análisis de expresión génica?

5. Hipótesis

El aceite esencial de *Lippia organoides* quimiotipo timol-carvacrol II extraído de plantas aromáticas colombianas afecta significativamente la expresión de genes relacionados con los mecanismos de comunicación celular y de formación de biopelículas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Determinar posibles mecanismos de acción del aceite esencial de *Lippia organoides* quimiotipo timol-carvacrol II durante la inhibición del *quorum sensing* y la formación de biopelículas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 mediante el análisis de la expresión génica.

6.2 Objetivos Específicos

- Determinar los efectos del aceite esencial de LOTC II sobre la expresión de genes de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 involucrados en la inhibición del *quorum sensing* y la formación de biopelículas.
- Correlacionar los cambios en la expresión génica de los microorganismos tratados con LOTC II, con los posibles mecanismos de acción anti-QS y antibiopelícula.

7. Materiales y métodos

7.1 Materiales

7.1.1 Cepas bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 fueron adquiridas comercialmente por el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM).

7.1.2 Material vegetal

La especie vegetal de *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II fue colectada en el nororiente colombiano por el Complejo Agroindustrial Piloto, Centro Nacional de Investigación para la Industrialización de Plantas Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), Universidad Industrial de Santander y fue identificada a nivel de especie (Stashenko et al. 2004). En el CENIVAM, el AE ***Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II** fue obtenido por hidrodestilación simple asistida por microondas (MWHD) y caracterizado por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS) (Stashenko et al. 2004). El material vegetal proviene de especies nativas, subcultivadas en el CENIVAM y poseen el permiso de acceso a recursos genéticos y productos derivados para investigación científica con fines de prospección biológica del Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. El material vegetal y sus productos derivados son proporcionados por el Estado Colombiano, a través del Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible.

7.2 Metodología experimental

La metodología experimental realizada en este trabajo de investigación se presenta de forma general en la **Figura 6**.

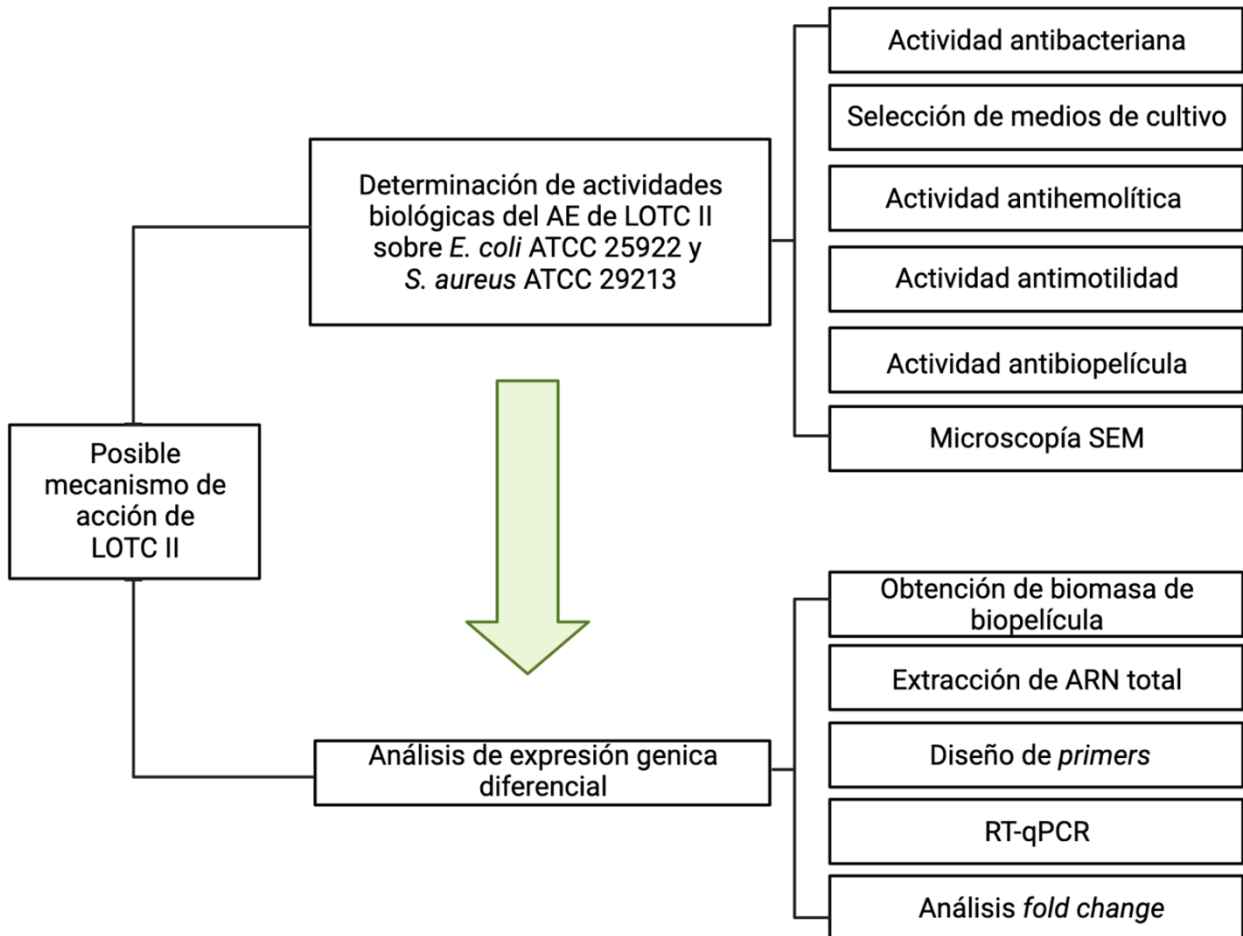


Figura 6. Esquema general de la metodología experimental realizada

7.2.1 Selección de medios de cultivo

La selección de los medios de cultivo se realizó con base en la literatura científica relacionada con la estimulación del crecimiento bacteriano y la formación de biopelículas de *E. coli* y *S. aureus*

(Crueguer and Crueger, 1993; Begot *et al.*, 1996) (**Tabla 7**). Para la selección del mejor medio de cultivo, se realizaron cinéticas de crecimiento para cada bacteria, mediante el método turbidimétrico (Krist, 1998) y para determinar la formación de biopelículas se realizó la técnica colorimétrica semicuantitativa descrita por O'toole (O'toole, 2011), las cuales se describen más adelante.

Los medios de cultivo utilizados para *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron Luria Bertani (LB), LB con 1% casaminoácidos, Medio mínimo 63 (M63), *Brain Heart Infusion* (BHI), Mueller Hinton (MH). Los medios de cultivo utilizados para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 fueron *Tryptic Soya Broth* (TSB), TSB con 0,3% NaCl, TSB con 2% glucosa, BHI y MH.

7.2.1.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano

Las cinéticas de crecimiento se realizaron lo describió Theophel y col., con algunas modificaciones (Theophel *et al.*, 2014). Se prepararon cultivos *overnight* de las cepas de *E. coli* y *S. aureus* en 3 mL de medio líquido BHI. Se ajustó el cultivo *overnight* de cada cepa a una escala de Mcfarland de 0,5 en cada medio seleccionado. Se sirvieron 200 μ L de inóculo en microplacas de poliestireno de fondo plano marca BRAND y se incubaron en agitación orbital de 200 rpm a 37 °C. Se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro BIORAD cada hora por diez horas. Cada experimento se realizó por triplicado.

7.2.1.2 Formación de biopelículas en *E. coli* y *S. aureus*

Para la formación de biopelículas se utilizó el método descrito anteriormente por O'toole (2011) con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en la característica del cristal violeta de unirse a

los polisacáridos de la matriz extracelular de la biopelícula, aumentando la intensidad del colorante de forma proporcional a la concentración de biomasa de la biopelícula (O'toole 2011). Se prepararon cultivos *overnight* de las cepas de *E. coli* y *S. aureus* en 3 mL de medio líquido BHI. Se ajustó el cultivo *overnight* de cada cepa a una escala de Mcfarland de 0,5 en cada medio seleccionado. Del cultivo *overnigh* ajustado se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 en medio fresco para realizar el inóculo en la microplaca. Se usaron microplacas de 96 pozos de poliestireno de fondo redondo BRAND como superficie para la formación de biopelícula. Las microplacas se incubaron por 24 y 48 h a 37 °C sin agitación. Después de la incubación, cada microplaca se lavó suavemente tres veces con solución salina al 0.9 % para desprender las células bacterianas no adheridas. Las células adheridas a la microplaca se tiñeron con cristal violeta al 0.4% p/v y se midió su absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas BIORAD C1000.

7.2.3 Actividad biológica del AE de LOTC II sobre *E. coli* y *S. aureus*

7.2.3.1 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del AE de LOTC II se realizó como lo describió Cáceres *et al.*, (2020) con algunas modificaciones. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó mediante el método de microdilución en caldo para bacterias en microplaca de fondo plano de 96 pozos marca BRAND. La solución madre de AE de LOTC II se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO) y se realizaron diluciones seriadas del AE en agua peptonada desde 1,5 hasta 0,09 mg/mL. Los experimentos se realizaron con un máximo de DMSO de 1% v/v. Se preparó el inóculo bacteriano de *E. coli* y *S. aureus* en medio LB a una concentración de 5×10^7 UFC/mL. Se añadieron 100 μ L de suspensión bacteriana y 100 μ L de cada dilución de aceite en cada pozo

para un volumen de trabajo de 200 μL . Se usaron 100 μL de suspensión bacteriana y 100 μL de agua peptonada para el control negativo. Se utilizaron Vancomicina y Ofloxacina como control positivo de inhibición. Las microplacas inoculadas se incubaron a 37 °C con agitación orbital de 200 rpm. Se determinó la densidad óptica a 595 nm cada hora durante 10 horas en un lector de microplacas BIORAD C1000. Cada experimento se realizó por triplicado.

7.2.3.2 Actividad antimotilidad *swimming* en *E. coli*

El ensayo de motilidad *swimming* se realizó como lo describió Dusane *et al.*, (2014) con algunas modificaciones (Yuan y Yuk, 2019). Para este ensayo, se preparó un cultivo *overnight* de *E. coli* ATCC 25922 en caldo LB incubado a 37° C, en agitación orbital a 200 rpm. A continuación, el cultivo se diluyó 100 veces en caldo LB fresco y se sembraron 100 μL en microplacas BRAND de fondo plano de 96 pocillos que contenían 100 μL de AE a concentraciones subinhibitorias. La microplaca se incubó durante dos horas a 37° C y se mantuvo en agitación orbital a 200 rpm. Los controles negativos se prepararon mezclando 100 μL de cultivo con 100 μL de caldo de peptona al 0,1% (sin AE). Posteriormente, se tomaron muestras de 2 μL a partir de los pozos de la microplaca, para sembrar en profundidad las placas de Petri con agar semisólido preparado con medio líquido LB y agar al 0,25%. A continuación, se mantuvieron en incubación a 37 °C durante 24 h. Al final de la incubación, se midieron los diámetros de la zona de natación en mm y se compararon con el cultivo de control, que no había estado en contacto con el AE. Los ensayos de motilidad se realizaron por triplicado.

7.2.3.3 Actividad antihemolítica sobre *S. aureus*

El ensayo de actividad antihemolítica se realizó de acuerdo con la metodología previamente descrita por Lee *et al.*, (2014) con algunas modificaciones. Se preparó un cultivo *overnight* de *S. aureus* ATCC 29213 en caldo LB a 37 °C y agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente se diluyó el cultivo cien veces en caldo LB fresco y se sembraron 100 µL en microplacas BRAND de 96 pozos fondo plano que contenían 100 µL del AE en concentraciones subinhibitorias. Posteriormente, la microplaca se incubó durante 16 h a 37 °C y se mantuvo en agitación orbital a 200 rpm. Los controles negativos se prepararon mezclando 100 µL de cultivo con 100 µL de caldo peptonado al 0.1% (sin contacto con el AE). Posteriormente, se centrifugó la microplaca a 4400 rpm durante 2 min a 4 °C. Para el ensayo de hemólisis, se preparó una suspensión de glóbulos rojos, centrifugando la sangre de conejo a 2000 rpm durante 2 min. Se recuperó el precipitado y se hicieron tres lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y posteriormente se preparó una suspensión de glóbulos rojos al 1% v/v en PBS. Para evaluar la hemólisis se mezclaron 100 µL del sobrenadante del cultivo de *S. aureus* sembrado en la microplaca con 100 µL de la suspensión de glóbulos rojos de conejo y se llevó a incubación a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4400 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante para finalmente medir absorbancia a una longitud de onda de 543 nm.

Se prepararon controles negativos del AE mezclados con la suspensión de glóbulos rojos, para corroborar que el AE no ocasionaba hemólisis. Teniendo en cuenta que la activación del sistema QS en *S. aureus* induce la expresión de α -hemolisina, la disminución en la cuantificación de α -

hemolisina en presencia del AE, se podría considerar como indicador de la inhibición del QS (Schilcher y Horswill, 2020).

7.2.4 Actividad Antibiopelícula del AE de LOTC II sobre *E. coli* y *S. aureus*

Se determinó la capacidad inhibición de la formación de biopelículas del AE de LOTC II sobre las cepas *E. coli* y *S. aureus*. La inhibición de la formación de biopelículas se determinó como lo describió Cáceres *et al.*, (2020) con algunas modificaciones. Se usaron microplacas de poliestireno de 96 pozos fondo redondo para la formación de *biofilm*. Se realizaron cultivos *overnight* de 3 mL de *S. aureus* en medio TSB y *E. coli* en medio LB. Se realizó una dilución 1:10 (6×10^6 UFC/mL) en medio LB para *E. coli* y una dilución 1:100 ($5,8 \times 10^5$ UFC/mL) en medio TSB con glucosa al 2% para *S. aureus*. Se transfirieron 100 μ L del inóculo bacteriano a cada pozo que contenía concentraciones subinhibitorias de AE de LOTC II. Se utilizaron 100 μ L de inóculo bacteriano y 100 μ L de agua peptonada como control de formación de biopelícula. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h. Después de la incubación, las microplacas se lavaron tres veces con solución salina tampón fosfato estéril (PBS pH 7,2) para eliminar las bacterias planctónicas. La biopelícula formada adherida al pozo se tiñó con cristal violeta 0,4% p/v. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La determinación del porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente formula:

Porcentaje de inhibición = (DO control negativo - DO tratado/ DO control negativo) * 100%

7.2.5 Análisis de biopelículas utilizando Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés)

La observación de los posibles cambios morfológicos de ambas bacterias se realizaron mediante SEM, siguiendo el protocolo de Singh *et al.*, (2018) con algunas modificaciones. De esta forma se determinaron las modificaciones estructurales de las biopelículas después del tratamiento con el AE LOTC II. La formación de biopelículas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 se llevó a cabo en cupones de vidrio (1 cm x 2 cm). Los cupones seleccionados se enjuagaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,2). La preparación de muestras para SEM se realizó de la siguiente manera: remojo de la muestra con glutaraldehído al 2.5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Los cupones se lavaron utilizando diferentes soluciones de alcohol isopropílico: 5, 15, 25, 50, 75 y 100% durante 5 minutos cada enjuague a temperatura ambiente.

7.2.6 Obtención de biomasa de biopelículas tratadas y no tratadas con LOTC II en biorreactores de 50 mL.

La obtención de biomasa de biopelículas tratadas y no tratadas con LOTC II se realizaron en biorreactores de vidrio de 50 mL, con cupones de vidrio esmerilado de aproximadamente 15 cm x 2 cm de área, como superficie de formación de biopelículas. El biorreactor contó con control de temperatura y de oxigenación. Los biorreactores tratados se inocularon 10^7 UFC/mL de *E. coli* en medio LB y 10^7 UFC/mL de *S. aureus* en medio TSB con una concentración sub-CMI₅₀ (0.375 mg/mL) del AE de LOTC II, la cual no tiene efecto sobre las células planctónicas y permita observar un efecto sobre la formación de biopelículas. El control sin tratamiento se inoculó con cultivo bacteriano y agua peptonada. Los biorreactores se incubaron a 37 °C por 24 h con oxigenación constante. Posteriormente, cada cupón de vidrio se lavó tres veces con salina tampón fosfato estéril (PBS pH 7,2) para eliminar células no adheridas. La biopelícula formada y adherida a los cupones se removió por medio de espátulas estériles en tubos falcon de 50 mL con agua

peptonada. De la biomasa raspada se realizó la extracción de ARN total. Se realizaron tres réplicas biológicas en cada ensayo. También se realizó un ensayo control con células planctónicas tratadas y no tratadas con el AE.

7.2.7 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó por medio del kit PureLink RNA mini kit (*Thermo Fisher Scientific*; U.S.A), a partir de las bacterias patógenas formadoras de biopelícula, tratadas y no tratadas con el AE. Las células presentes en la biomasa de la biopelícula se lisaron y homogenizaron por medio del compuesto isotiocionato de guanidina. Las muestras se procesarán por medio de una membrana a base de sílice, realizando lavados del ARN total purificado y eluyendo en agua libre de RNasas (pH 7,5). La purificación del ARN total se evaluó mediante el equipo IMPLEN NanoPhotometer NP80, donde se evaluó la pureza como un estimado de la cantidad de ARN obtenido.

7.2.8 Obtención de ADNc

La síntesis de ADNc a partir del ARN total extraído se realizó mediante el kit de síntesis de ADNc *RevertAid™ H Minus First Strand* (Fermentas, *Thermo Fisher Scientific*, Madison, WI). De cada muestra de ARN total extraído se sintetizó ADNc. Las muestras ADNc sintetizadas se prepararon a una concentración final de 10 ng/mL.

7.2.9 Diseño de *primers*

Se usaron los programas Primer3 (Untergasser et al., 2012), OligoCalc (Kibbe, 2007) y *SnapGene Tool and Viewer* para diseñar cebadores específicos de genes. El diseño de los *primers*

se siguió siguiendo los parámetros recomendados por la NCBI en sus protocolos. La generación de los *primers* se realiza de manera aleatoria en los software mencionados, por lo cual, se citan los estudios en los cuales ya han sido usados. Los genes seleccionados para cada microorganismo están relacionados con la formación de biopelículas, sistema de comunicación QS y regulación de características bacterianas como la patogenicidad y la virulencia. Los genes se seleccionaron de acuerdo con la revisión bibliográfica mostrada en las **Tablas 3, 4 y 5**.

7.2.10 Análisis de expresión diferencial de genes

Los ensayos de RT-qPCR se realizaron utilizando la mezcla maestra de qPCR universal Luna® de *Sybr green* (New England Biolabs, Ipswich, Ma, EE. UU.) En un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, las reacciones se prepararon con un volumen final de 20 µL que contenía mezcla maestra 1X, 0,25 µM de cada cebador, 100 ng de ADNc molde y agua. Los programas de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg y 55-60 °C durante 45 seg. Los controles negativos (NTC) consistieron en omisiones de cualquier molde de ADNc de una reacción. La normalización de las curvas de amplificación de los genes relacionados con el sistema QS, la formación de biopelículas y la patogenicidad se determinaron utilizando genes *housekeeping* en *S. aureus* (*nuc*) y *E. coli* (*rssA*) como referencia. La expresión génica y el cálculo de la eficiencia se realizó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

7.2.11 Análisis estadístico

Las pruebas de actividad antimicrobiana, antibiopelícula y antiQS se realizaron por triplicado y fueron validadas a través de ANOVA unidireccional con un nivel de significancia del 5%. Para el análisis de la expresión diferencial de genes se realizó la prueba de Welch (2 Grupos) con la prueba de corrección de Bonferroni (empleado para comparaciones múltiples) tomando un valor de significancia estadística (p) de 0.05.

8. Resultados y Discusión

8.1 Caracterización del AE de LOTC II por GC/M

La información de la composición relativa de los principales componentes de LOTC II fue suministrada por el CENIVAM (**Tabla 7**).

Tabla 7. Principales cinco componentes mayoritarios presentes en LOTC II. Se expresa en porcentaje la cantidad relativa de cada compuesto.

Código	Especie de planta	Quimiotipo	Componentes mayoritarios
LOTC	<i>Lippia origanoides</i>	timol-carvacrol II	γ -Terpineno (5,2%), p-cimeno (1.1%), timol (32,7%), carvacrol (18.8%) y <i>trans</i> - β -cariofileno (6.4%)

Los resultados de la caracterización mostraron que los componentes mayoritarios del AE de *Lippia origanoides* corresponden al timol y al carvacrol con un 32,7 % y un 19 % respectivamente, por lo cual se clasificó como quimiotipo timol-carvacrol II. Cabe resaltar que *Lippia origanoides* es una especie vegetal endémica de algunos países Suramérica y Centroamérica, por lo cual solo se puede encontrar en países como México, Guatemala, Brasil y Colombia (Dos Santos *et al.*, 2004). *Lippia origanoides* como parte de la cultura suramericana ha sido ampliamente utilizada como especia y como tratamiento casero contra diferentes “malestares”, entre las cuales están: dolor de estómago, dolor de cabeza, cólicos en bebés, indigestión, diarrea, pirosis, náuseas, flatos y “barriga femenina” (Oliveira, 2004). En diferentes estudios de AEs derivados de *Lippia origanoides* se ha evidenciado que pueden tener una composición relativa similar, sin embargo, el porcentaje de sus componentes principales puede variar. Como ejemplo encontramos la investigación realizada por Oliveira y col., donde se determinó que el AE de LOTC contenía carvacrol (42,9 %), p-cimeno (15,8 %) y al timol (5,1 %) como componentes mayoritarios mientras que Dos Santos y col., determinaron que LOTC contenía carvacrol (38,6 %), timol (18,5 %) y p-cimeno (10,3 %) (Dos Santos *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción del carvacrol y el timol aún no ha sido completamente dilucidado, se ha propuesto que pueden actuar mediante la ruptura de la membrana celular, lo que conlleva a un aumento de su permeabilidad, deterioro del potencial de membrana, alteración de gradientes de pH, fugas de nutrientes intracelulares, fuga de electrolitos y daño de proteínas estructurales, culminando en la lisis celular (Kachur and Suntres, 2020).

8.2 Selección de medios de cultivo

8.2.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano

Las cinéticas de crecimiento bacteriano en *E. coli* y *S. aureus* permitieron determinar los mejores medios de cultivo para promover el crecimiento de células planctónicas hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Las cinéticas de crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* se muestran en las **Figuras 7 y 8** respectivamente.

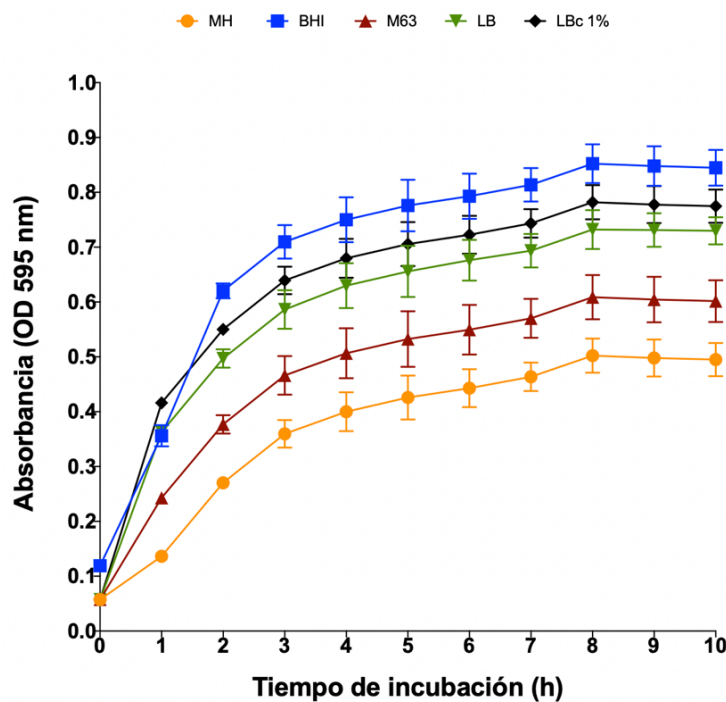


Figura 7. Cinética de crecimiento planctónico de *E. coli* ATCC 25922 en cada medio seleccionado, incubación de 10 h a 37 °C con agitación orbital (200 rpm). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

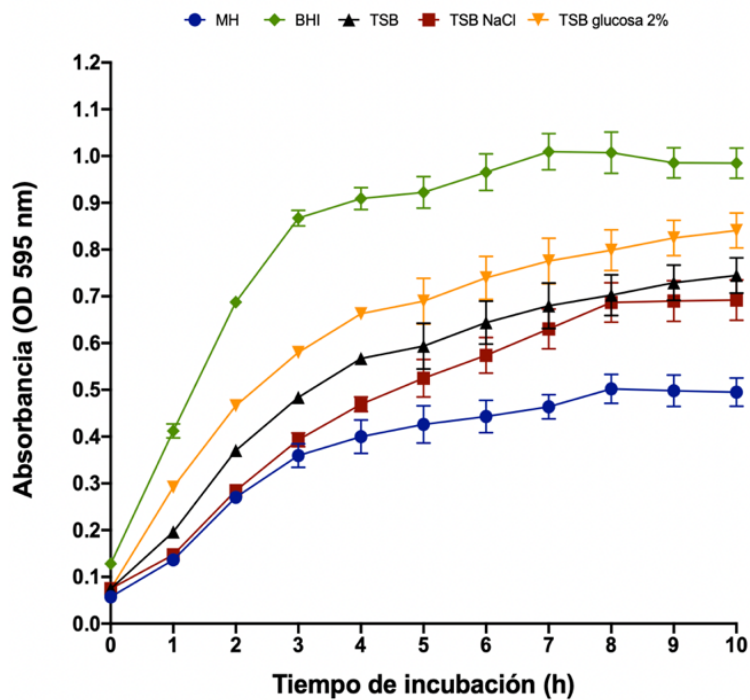


Figura 8. Cinética de crecimiento plancónico de *S. aureus* ATCC 29213 en cada medio seleccionado, incubación de 10 h a 37 °C con agitación orbital (200 rpm). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los medios de cultivo BHI, LB y LB suplementado con casaminoácidos 1%, TSB y TSB suplementado con glucosa 2% son los medios que promueven el crecimiento máximo del estado plancónico de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATC 29213 respectivamente. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos, en los cuales los investigadores demostraron que suplementar los medios de cultivo nutritivos mejoraba el crecimiento de los microorganismos, aumentando la velocidad específica de crecimiento, permitiendo un crecimiento constante en el transcurso de siete h de incubación (Tessler *et al.*, 1992; Carbonell *et al.*, 2002; Bar-Even *et al.*, 2013; Wijesinghe *et al.*, 2019).

8.2.2 Formación de biopelículas en *E. coli* y *S. aureus*

Los medios de cultivo seleccionados en las cinéticas de crecimiento también se utilizaron para la evaluaron en la formación de biopelículas en *E. coli* y *S. aureus*. Se determinó cual medio favorecía la formación de una mayor biomasa de biopelícula en cada microorganismo. Al obtener una mayor biomasa de biopelícula de cada cepa se garantizó una concentración de células sésiles suficiente para realizar la extracción ARN total para el estudio transcriptómico. Los resultados de la formación de biopelículas en *E. coli* y *S. aureus* se presentan en las **Figura 9** y **10** respectivamente.

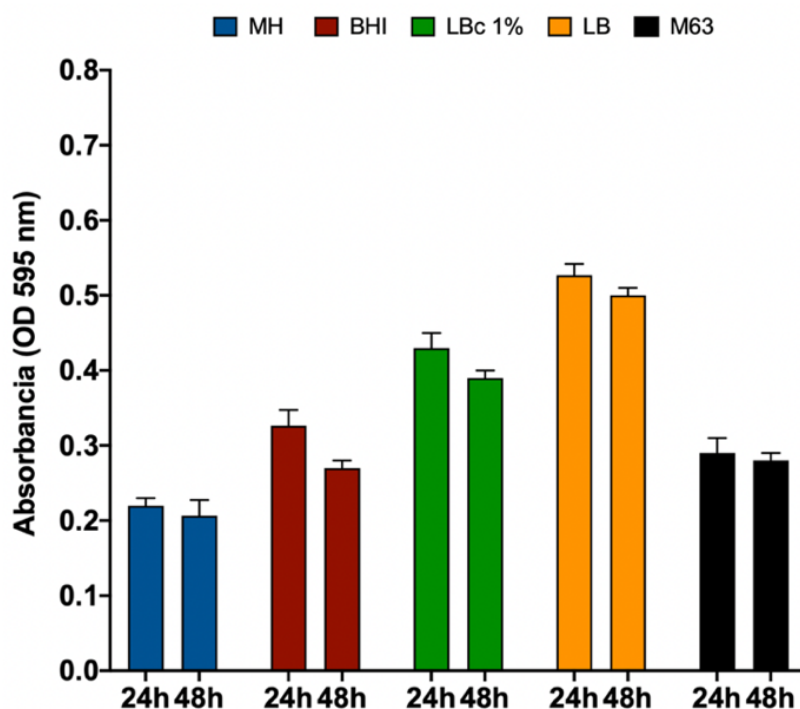


Figura 9. Cuantificación de la formación de biopelícula de *E. coli* ATCC 25922 en los medios evaluados (MH, BHI, LB-casaminoácidos 1%, LB, M63), con incubación de 24 y 48 h a 37 °C sin agitación orbital. Cada experimento se realizó por triplicado.

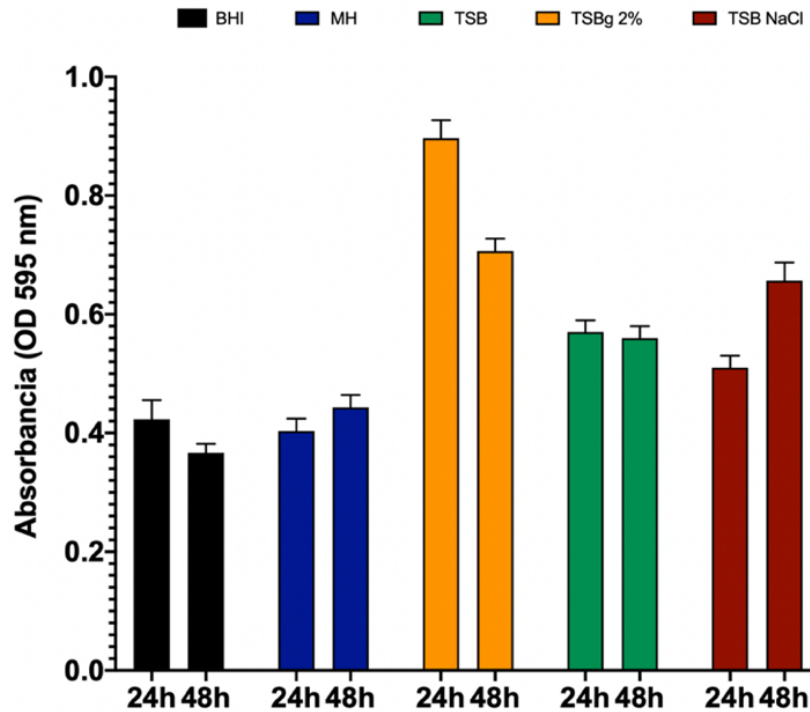


Figura 10. Cuantificación de la formación de biopelícula de *S. aureus* ATCC 29213 en los medios evaluados (BHI, MH, TSB, TSB-glucosa 2%, NaCl), con incubación de 24 y 48 h a 37 °C sin agitación orbital. Cada experimento se realizó por triplicado.

Durante la formación de biomasa de biopelícula de los microorganismos evaluados, se observó que los medios de cultivo que permitieron el mayor desarrollo de células sésiles fueron LB y TSB-glucosa 2% para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. Los resultados obtenidos se asocian a la composición nutricional de cada medio. En el caso del medio de cultivo LB, se ha mencionado que contiene gran contenido de nutrientes, electrolitos, aminoácidos, péptidos junto con diferentes vitaminas y carbohidratos que favorecen el crecimiento óptimo de diferentes especies bacterianas (Macwilliams y Liao, 2006). Para la formación de biopelículas el medio LB provee peptonas y extracto de levadura que proporcionan vitaminas y oligoelementos necesarios para la adhesión y producción de EPS. Además, el medio LB contiene bajas concentraciones de azúcares lo que

favorece el crecimiento planctónico en una primera fase, y al agotarse la fuente de carbono proveniente de los azúcares, el metabolismo bacteriano cambia para usar los aminoácidos como fuente de carbono, esto favorece el cambio de estado entre células planctónicas a sésiles en una segunda fase (Sezonov y d'Ari, 2017).

Por otra parte, el medio de cultivo TSB suplementado con glucosa al 2% provee un ambiente condicionado para la formación de biopelículas en *S. aureus*. El medio TSB es el medio de cultivo comúnmente utilizado para el ensayo de formación de biopelículas en bacterias Gram positivas, ya que provee los nutrientes y el ambiente necesario para la producción de polímeros extracelulares como el polisacárido Intracelular Adhesina (PIA) y el Poli-beta N-Acetil Glucosamina (PNAG) (Manner *et al.*, 2017). Diferentes autores han comprobado el efecto de diferentes concentraciones de glucosa como suplemento en medio TSB para mejorar la formación de biopelículas en *S. aureus*. Fernández-Barat y col., probaron concentraciones adicionales de glucosa en medio TSB desde 0,25% hasta 1%, encontrando que a mayor concentración de glucosa mejoraba la formación de biopelículas en cepas de *S. aureus* (Fernández-Barat *et al.*, 2018). Adicionalmente, Lade y col., demostraron que el medio de cultivo TSB suplementado con glucosa dió como resultado una formación de biopelículas más consistente para ensayos de microtitulación en placa de 96 pozos, por lo que se observaron resultados con menor variación entre réplicas (Lade *et al.*, 2019).

De acuerdo con algunas investigaciones, la glucosa en el medio TSB provoca la secreción de ácidos grasos de cadena corta que resultan del metabolismo bacteriano de *S. aureus*, lo que reduce el pH en el medio circundante y a su vez regula el sistema QS en *S. aureus*. Un pH ácido reprime

la producción de proteasas extracelulares y estimula la asociación de proteínas de la matriz extracelular de biopelícula en la superficie celular. Adicionalmente, el pH ácido estimula el ensamblaje funcional amiloide, lo que resulta en una mayor producción de biopelícula (Croes *et al.*, 2009; Boles *et al.*, 2011). La selección del medio de cultivo se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento y la formación de biomasa de biopelícula en cada cepa.

8.3 Actividad biológica de LOTC II sobre *E. coli* y *S. aureus*

8.3.1 Actividad antibacteriana de LOTC II

La Concentración Mínima Inhibitoria capaz de inhibir el 50% de la población bacteriana (CMI₅₀) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del AE en cada cepa se presentan en la **Tabla 8**. Los resultados mostraron el gran potencial del AE de *Lippia organoides* para inhibir el crecimiento bacteriano de *S. aureus* y *E. coli* a concentraciones de CMB y CMI₅₀ de 0,75 y 0,45 mg/mL respectivamente.

Tabla 8. Actividad antibacteriana del AE de LOTC II sobre *E. coli* y *S. aureus* expresada en CMI₅₀ y CMB determinada mediante microtitulación en placa. Se utilizaron Ofloxacina y Vancomicina como control positivo de inhibición.

Aceite esencial	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
	MIC ₅₀ (mg/mL)	MCB (mg/mL)	MIC ₅₀ (mg/mL)	MCB (mg/mL)

LOT C II	0,45	0,75	0,45	0,75
Controles	MIC₅₀ (mg/mL)	MCB (pmg/mL)	MIC₅₀ (mg/mL)	MCB (mg/mL)
Ofloxacina	0,12	0,25	-	-
Vancomicina	-	-	0,12	0,25

Se ha comprobado que los AE son compuestos con alta actividad antimicrobiana y que tienen baja toxicidad en los mamíferos, por lo cual, se han reconocido como potenciales candidatos en la formulación de nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas. De acuerdo con los resultados obtenidos, LOT C II mostró una fuerte inhibición del crecimiento bacteriano, con resultados similares en *E. coli* y *S. aureus*. Diferentes estudios han demostrado una alta actividad antibacteriana de AE de diferentes quimiotipos de *Lippia origanoides* sobre diferentes bacterias patógenas (Nikolić *et al.*, 2014; Al-Ani *et al.*, 2015; Oliveira, *et al.*, 2015; Mahboubi *et al.*, 2017; Berdejo *et al.*, 2019). La potente actividad bactericida de AE de los diferentes quimiotipos de *Lippia origanoides* se ha relacionado con la composición química de sus metabolitos, en los cuales se destacan como componentes principales: el timol, carvacrol, terpineno y cimeno. La alta actividad antibacteriana de LOT C II mostrada en este estudio, se relaciona principalmente a la presencia de timol (32,7%) y carvacrol (18,8%) entre de sus cinco principales metabolitos (**Tabla 7**). Las interacciones entre componentes principales junto con los componentes minoritarios podrían ser sinérgicas, antagonistas o neutros según el microorganismo estudiado, por lo cual, el efecto del AE esencial podría variar entre microorganismos (Marinelli *et al.*, 2018; Valdivieso-

Ugarte *et al.*, 2019). Además, se ha documentado que un AE de un quimiotipo de la misma planta puede presentar variaciones en la composición relativa de sus metabolitos, lo cual dependerá de las condiciones de cultivo del material vegetal, es decir, de la zona geográfica del cultivo, la edad y genética de la planta, las condiciones ambientales de crecimiento, la calidad del abono, entre otras (Stashenko *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2014). De acuerdo con lo anterior, es posible encontrar diferentes resultados de actividad biológica entre quimiotipos de una misma planta.

Los valores de CMI y la CMB obtenidas en este estudio estuvieron en el rango de 1 a 5 mg/mL, valores que se encuentran por debajo de los obtenidos en otras investigaciones, que probaron aceites derivados de *Lippia origanoides* (Dos Santos *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2014; Sarrazin *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2019). La actividad biológica del timol se ha asociado a actividad antioxidante, analgésica, anticonceptiva, antiinflamatoria, antifúngica, antibacteriana, antibiopelícula y anticancerígena (Peixoto-Neves *et al.*, 2010). El mecanismo antibacteriano que se ha propuesto para el timol corresponde a su capacidad para desintegrar la membrana externa de bacterias Gram negativas, liberando lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Lambert *et al.*, 2001; de Souza *et al.*, 2010). En este sentido, Ferreira y col., probaron el efecto del timol sobre monocapas de lípidos y analizaron la interacción entre el timol y el lípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, por sus siglas en inglés) Los resultados mostraron que el timol disminuye la elasticidad de la superficie membranal y cambia la morfología del DPPC, lo que demuestra que el compuesto se incrusta entre los lípidos de membrana. Por otra parte, el mecanismo antibacteriano planteado para el carvacrol se relaciona con su actividad de transportador de membrana catiónica monovalente, intercambiando su protón del grupo hidroxilo con otro ion como el Potasio (K⁺); el carvacrol no disociado (protonado) se difunde a través de la

membrana citoplasmática hacia el citoplasma donde se disocia liberando su protón. Esto se basa en el flujo de salida de K^+ y el flujo de entrada de H^+ observado en *Bacillus cereus* expuesto a carvacrol. Por lo anterior, el efecto antibacteriano del carvacrol se relaciona con la afectación de la membrana de bacterias Gram positivas y su posible interacción con reguladores metabólicos dentro de la célula (Ultee *et al.*, 2002; Saad *et al.*, 2013).

Entre los componentes mayoritarios del AE de LOTC II también se determinó el cimeno y el terpineno, compuestos asociados con efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, ansiolíticos y antimicrobianos (de Santana *et al.*, 2015). Las propiedades antibacterianas de estos compuestos han sido evaluadas por diferentes autores y se ha determinado que como compuestos independientes no confieren actividad antibacteriana al AE, sin embargo, potencian la actividad de otros compuestos antimicrobianos ejerciendo un efecto sinérgico (Xue y Yujian *et al.*, 2020). Debido a la capacidad del AE de LOTC II para afectar la membrana de microorganismos Gram negativos y Gram positivos, lo convierte en un excelente candidato para la evaluación de terapias combinadas con antibióticos, lo que daría como resultado tratamientos con potencial de amplio espectro.

8.3.2 Actividad antimotilidad *swimming* en *E. coli*

La motilidad *swimming* en bacterias Gram negativas como *E. coli* promueve la migración en el medio de cultivo según el gradiente de nutrientes disponible. Además, facilita la adhesión preparando a las células bacterianas para entrar en contacto con la superficie, paso indispensable para la formación de biopelículas (Yang *et al.*, 2016). Por lo tanto, se evaluó la capacidad de motilidad *swimming* de *E. coli* ATCC 25922 en presencia y ausencia de LOTC II. La presencia de

motilidad *swimming* se midió como el diámetro (en mm) de la zona de expansión. En la **Figura 11**, se muestran los resultados de la actividad antimotilidad de diferentes concentraciones subinhibitorias LOTC II sobre *E. coli*.

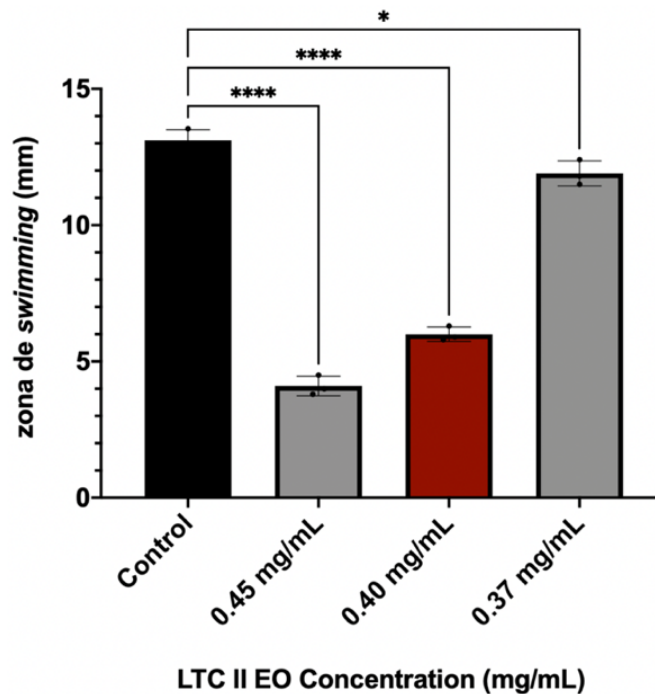


Figura 11. Efecto de las concentraciones subinhibitorias del AE de LOTC II sobre *E. coli*. Los cultivos se incubaron durante 24 h y 37 °C, utilizando medio LB semisólido. En rojo se muestra la barra con la concentración sub-MIC₅₀ de LOTC II. El porcentaje de inhibición se calculó midiendo el halo de crecimiento en mm, teniendo en cuenta la zona de nado producida por el cultivo control (sin tratamiento). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se analizaron mediante ANOVA. ****p<0.0001, * p<0.0158.

A partir de los resultados obtenidos se demostró que a concentraciones subinhibitorias desde 0,45 a 0,37 mg/mL el AE tuvo un efecto antimotilidad *swimming* significativo del 69, 55 y 10% respectivamente. Es de resaltar, que a 0,40 mg/mL el AE no tiene efecto sobre la viabilidad de las células planctónicas por lo cual el efecto antimotilidad podría estar relacionado con rutas de

producción-ensamblaje de flagelos y pili o podría estar afectando el mantenimiento y el funcionamiento de los flagelos mediante la afectación de la permeabilidad de la membrana bacteriana (Ravichandar *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020). Estos resultados son interesantes, considerando que otros autores han establecido una relación muy estrecha entre la motilidad y las primeras etapas de la formación de biopelículas en *E. coli* (Yang *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2020).

Los sistemas flagelares y de quimiotaxis son esenciales para la patogénesis completa de *E. coli*, ya que las células móviles pueden nadar hacia un ambiente beneficioso y alejarse de compuestos tóxicos o cambios desfavorables en el medio, por lo que tienen mayores probabilidades de supervivencia (Parkinson *et al.*, 2015). Como se mencionó anteriormente, los flagelos juegan un papel esencial en la adhesión, formación y desprendimiento de biopelículas, secreción de moléculas efectoras y la defensa contra el sistema inmune del huésped. Sin embargo, los sistemas de quimiotaxis son fisiológicamente costosos para las bacterias, requiriendo entre el 2 y 3% de proteínas celulares totales para llevar a cabo estas funciones (Inamuco *et al.*, 2012; Chaban *et al.*, 2015). Por lo cual, al estar en contacto con el AE la bacteria podría dar prioridad a sistemas de supervivencia por encima del sistema de motilidad.

Se ha evidenciado que los AEs podrían dañar las membranas bacterianas incluso en concentraciones subinhibitorias, disipando el potencial de membrana e inducir una fuga de ATP intracelular y metabolitos en las bacterias tratadas (Ferreira *et al.*, 2016). Por lo tanto, se espera que en concentraciones subinhibitorias del AE de LOTC II, *E. coli* reprima sus sistemas de motilidad y conserve energía para actividades de viabilidad celular y reparación de daños hasta que se proporcionen condiciones de crecimiento óptimas. De igual forma, el contacto con el AE

podría estar alterando la regulación transcripcional de genes relacionados a los sistemas de motilidad y adhesión, tales como, *fliA*, *motA*, *motB*, *fimH* y *csgD*, lo cual se ha evidenciado en investigaciones con diferentes AE (Yuan y Yuk, 2019; Oroh *et al.*, 2020).

8.3.3 Efecto de actividad anti-hemolítica del AE de LOTC II sobre *S. aureus*

Se evidenció la capacidad del AE de LOTC II de reducir significativamente el efecto hemolítico de *S. aureus* ATCC 25922 en un 54 y 12 % a concentraciones subinhibitorias (**Figura 12**) ($p < 0.0001$). Este es un resultado interesante, debido a que, se ha demostrado que la producción de diferentes tipos hemolisinas producidas por *S. aureus* promueven su capacidad de infección, colonización y supervivencia en infecciones humanas. Además, se ha evidenciado que la producción de estas toxinas está asociada con la activación del sistema QS en las primeras etapas de la formación de biopelículas (Yarwood *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2017).

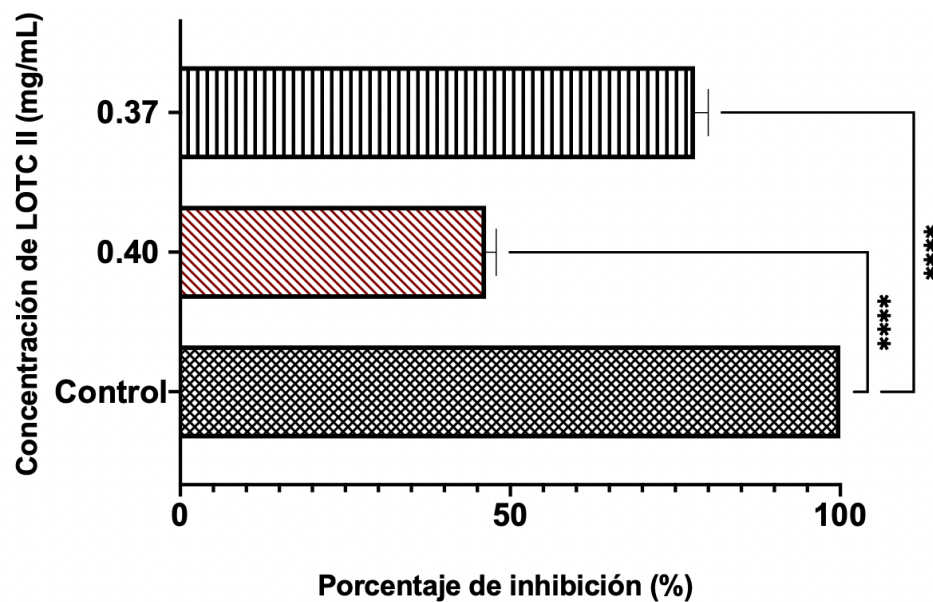


Figura 12. Efecto del AE de LOTC II a concentraciones subinhibitorias sobre la actividad hemolítica de *S. aureus* ATCC 29213 después de 16 h de cultivo en medio LB a 37 °C. El

porcentaje de inhibición se calculó considerando la actividad hemolítica del cultivo control (sin tratamiento con el AE). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se analizaron mediante ANOVA (**** $p = p < 0.0001$).

Se ha documentado que α -hemolisina es la principal toxina con actividad hemolítica en *S. aureus* y además contribuye en la formación de biopelículas (Caiazza y O'toole, 2003). La patogenicidad en *S. aureus* está determinada por la expresión de diversos factores de virulencia; dentro de los más importantes encontramos proteínas de membrana, histidin quinasa, lipoproteínas y toxinas extracelulares. Las toxinas extracelulares hemolíticas parecen estar reguladas por sistemas relacionados a las vías de comunicación celular. Específicamente la producción de α -hemolisina está determinada por la regulación del operón P3 (RNA III-hla), que, a su vez está regulado por el sistema de señalización agr, es decir, el sistema de comunicación QS en *S. aureus* (**Figura 3**) (Utari, 2017; Malachowa y DeLeo, 2018). Considerando que la autoregulación del sistema QS en *S. aureus* está mediada por el operón P2, que a su vez activa la regulación del operón P3 induciendo la producción de α -hemolisina, la disminución en la cuantificación de α -hemolisina en presencia del AE de LOTC II se consideraría un indicador de inhibición de las rutas de comunicación QS.

Por otra parte, los reguladores globales de los factores de virulencia en *S. aureus* (*agr*, *sarA* y *sae*) controlan coordinadamente la expresión del gen *hla*, donde el sistema agr (QS) y *sarA* parecen jugar un papel importante (Duan *et al.*, 2018). Muchos estudios han demostrado que algunos inhibidores químicos y fármacos pueden inhibir significativamente la patogenicidad de *S. aureus* al inhibir la transcripción de los reguladores globales de virulencia. Esta regulación podría ser a nivel transcripcional (*agr*, *sae*) o traslacional (*sarA*, *agr*) por estos reguladores (Montgomery *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta lo anterior, el AE de LOTC II también ha sido documentado como fuerte inhibidor del sistema QS en bacterias Gram negativas. En el estudio realizado por Cáceres y col., mediante pruebas anti-QS con la cepa biosensora *Chromobacterium violaceum* CV026, determinaron que el AE de LOTC II inhibió la producción de violaceína en un 88.86% a una concentración subinhibitoria de 0.3 mg/mL (Cáceres *et al.*, 2020). La violaceína es un pigmento púrpura que *C. violaceum* produce al comunicarse por el sistema QS LuxR-LuxI, CVIR-Cvil y la molécula autoinductora N-Hexanoyl-1-homoserin lactona (Poli *et al.*, 2018). De acuerdo con los resultados obtenidos por Cáceres y col., el efecto del AE de LOTC II sobre el sistema QS de bacterias Gram negativas podría estar asociado a su composición monoterpénica (timol y carvacrol) que podrían estar inhibiendo la síntesis y reconocimiento del autoinductor o bloqueando la regulación transcripcional de las proteínas relacionadas en la detección de *quorum* (Figura 5). Con base en lo mencionado anteriormente, el AE de LOTC II es un potencial inhibidor de los sistemas QS tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Además, podría ser una alternativa para el desarrollo de nuevas moléculas anti-QS dirigidas a microorganismos en los cuales su patogenicidad esté mediada por sistemas de comunicación celular.

8.4 Actividad antibiopelícula de LOTC II sobre *E. coli* y *S. aureus*

El efecto de antibiopelícula de LOTC II sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 se muestra en la **Tabla 9** y la **Figura 14**. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de la Biopelícula (CMIB), que es la concentración en la cual el AE tiene el mayor efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas con un porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico menor al 10% (**Figura 14**). Lo anterior, garantiza que el efecto del AE se relacione directamente

con las rutas de formación de biopelículas y no sobre el crecimiento bacteriano. El AE de LOTC II tuvo un efecto inhibitor de la formación de biopelículas sobre *E. coli* y *S. aureus* de un 76 y 71% respectivamente, a una concentración CMIB de 0.40 mg/mL.

Tabla 9. Efecto en la formación de biopelículas de concentraciones subinhibitorias del AE de LOTC II sobre *E. coli* y *S. aureus*. Los experimentos se realizaron por triplicado por microtitulación en placa, por 24 h a 37°C. Se determinó la concentración de bacterias planctónicas presentes en el medio mediante conteo en placa, en medio MH.

LOTCC II (mg/mL)	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>S. aureus</i> ATCC 29213		
	Absorbancia (OD 595 nm)	inhibición biopelículas (%)	Células planctónicas (UFC/mL)	Absorbancia (OD 595 nm)	inhibición biopelículas (%)	Células planctónicas (UFC/mL)
0.37	0,410	24	5 x 10 ⁶	0,730	19	4,1 x 10 ⁸
0.40	0,134	76	3,9 x 10 ⁶	0,253	72	3,6 x 10 ⁸
0.45	0,034	94	1,9 x 10 ⁶	0,045	95	18,5 x 10 ⁷
Control	0,540	-	4,3 x 10 ⁶	0,896	-	3,9 x 10 ⁸

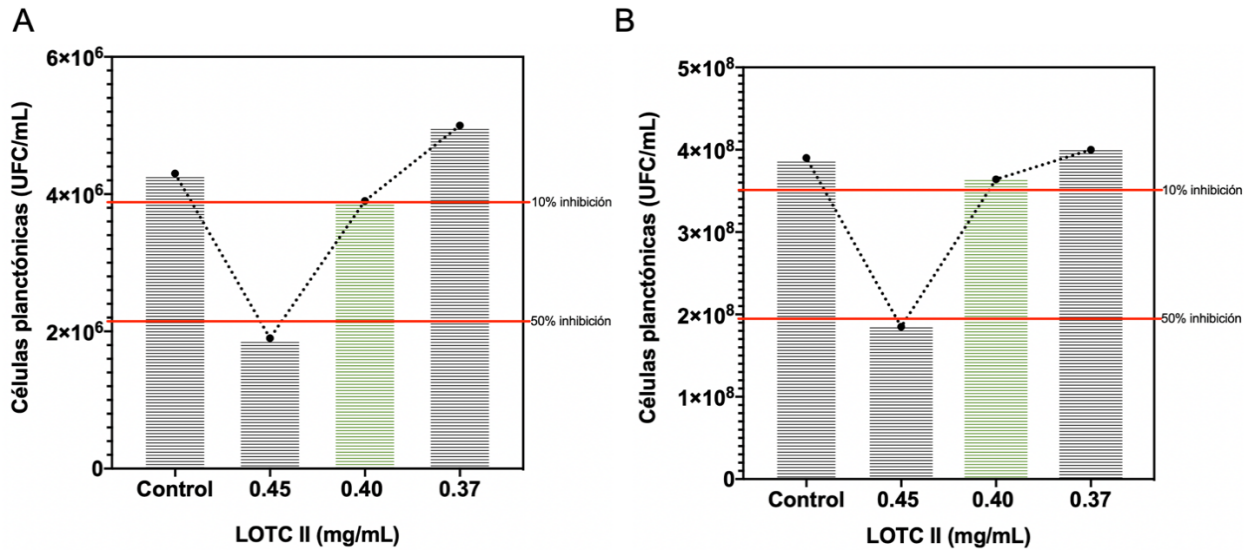


Figura 13. Efecto antibiopelícula de diferentes concentraciones subinhibitorias del AE de LOTC II sobre **A.** *E. coli* ATCC 25922; **B.** *S. aureus* ATCC 29213. Los experimentos se realizaron por microtitulación en placa por 24 h a 37°C sin agitación. Cada experimento se realizó por triplicado y se analizaron mediante ANOVA (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.0002$).

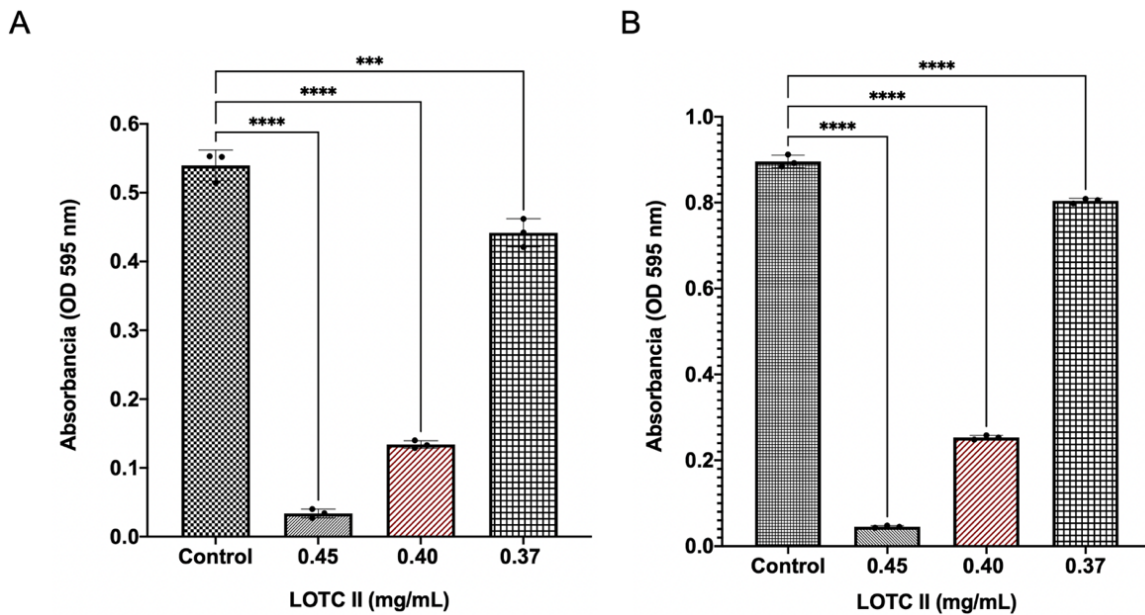


Figura 14. Efecto de concentraciones subinhibitorias del AE de LOTC II sobre las células planctónicas de **A.** *E. coli* ATCC 25922; **B.** *S. aureus* ATCC 29213, presentes en el medio de cultivo en los experimentos de la formación de biopelículas. Se realizó por conteo en placa, en medio MH a 37°C sin agitación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestra con líneas rojas los rangos de inhibición del 10 y 50%.

Diversos estudios han demostrado la actividad de diferentes AE sobre la formación de biopelículas, donde se resaltan los AE compuestos mayoritariamente por monoterpenos fenólicos como eugenol, carvacrol y timol. En este estudio se comprobó el efecto antibiopelícula del AE de LOTC II sobre microorganismos con características de formación de biopelículas diferentes. La concentración sub-CMIB de 0,40 mg/mL determinada en este estudio fue mucho mas baja que las reportadas por diferentes estudios actuales, como Furlani y col., que reportaron una MICB de 0,5 mg/mL (Furlani *et al.*, 2021) o Oliveira y col., que reportaron una MICB de 0,6 mg/mL (Oliveira *et al.*, 2020).

El efecto antibiopelícula asociado a productos naturales con gran contenido de monoterpenos fenólicos se asocia con la inhibición del QS, inhibición de factores de adhesión y motilidad, inhibición o disminución de factores de virulencia, disminución o inhibición de producción de EPS, colapso de la fuerza motriz del protón debido a la actividad inhibidora de ATPasa, disminución de la energía en forma de ATP, bloqueo del flujo de sustancias e inhibición de diferentes rutas transcripcionales y postranscripcionales que aún no se han estudiado en profundidad (Burt *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2019). Algunos autores han determinado la relación del efecto antibiopelícula con las vías de QS de *E. coli* posee diferentes rutas QS, incluido el sistema de señalización basado en indol, que influye tanto en la formación de biopelículas como en la motilidad de natación y quimiotaxis. La inactivación de las rutas de AI-2 y AI-3 en *E. coli* conduce a la pérdida de motilidad y adhesión, disminución en la producción de EPS y pérdida de agrupación celular (Song y Wood, 2021). La pérdida de motilidad *swimming* de *E. coli* se evidenció en este estudio.

En el caso de *S. aureus*, otros autores han demostrado que el timol y el carvacrol alteran la regulación del sistema QS (agr) de este microorganismo. La alteración del sistema QS en *S. aureus* puede afectar diferentes rutas de regulación y señalización incluida la autorregulación del sistema agr. La alteración de las diferentes rutas del sistema agr podría inhibir la producción de adhesinas y proteínas extracelulares asociadas al desarrollo de la biopelícula. Por otra parte, la aceleración del sistema agr conduce a la inhibición del operón *icaABDC*, regulador transcripcional encargado de la producción de PIA y PNAG, componentes principales del exopolisacárido de *S. aureus* (Kim *et al.*, 2017; Schilcher y Horswill, 2020). En este estudio se evidenció la afectación del sistema agr en *S. aureus* determinado por la disminución de producción de α -hemolisina.

8.5 Análisis de biopelículas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se analizó el efecto del AE de LOTC II sobre la morfología y estructura de las biopelículas de *S. aureus* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 29213. Se evaluó analizando muestras tratadas y no tratadas con el AE mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). En la **Figura 15**, se muestran las micrografías de las biopelículas de ambas cepas antes y después del tratamiento. Los resultados obtenidos se relacionan directamente con el efecto antibiopelícula del AE de LOTC II observado en la actividad por microtitulación previamente cuantificada.

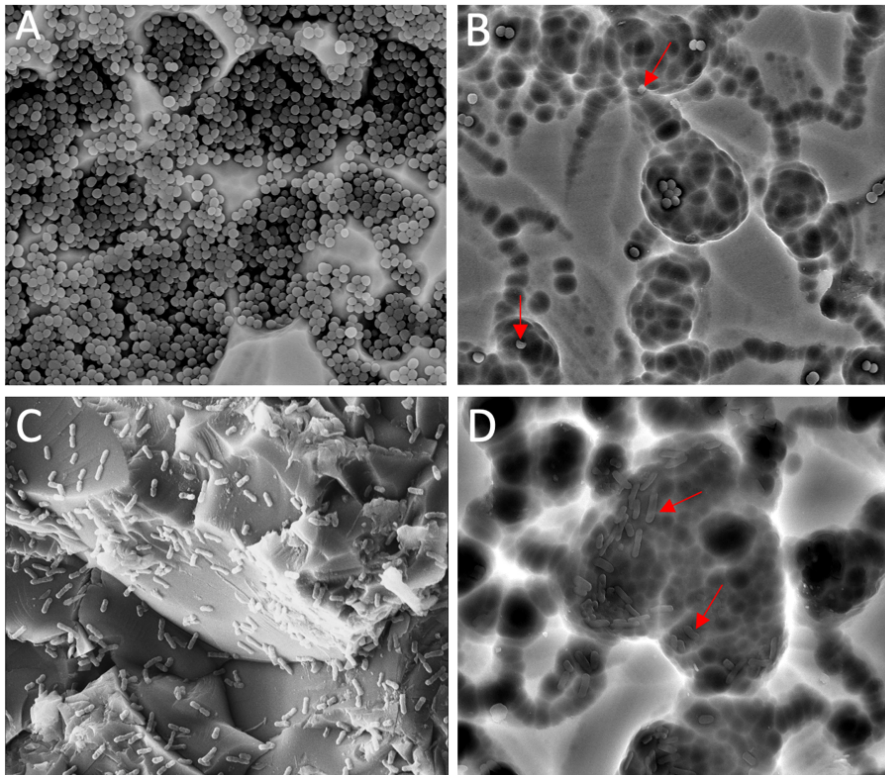


Figura 15. Micrografías SEM que muestran el efecto del AE de LOTC II (0,40 mg/mL) sobre la morfología y estructura de las biopelículas después de 24 h de cultivo. **A.** Biopelícula de *S. aureus* ATCC 29213 sin tratamiento; **B.** Biopelícula de *S. aureus* tratada con el AE de LOTC II; **C.** Biopelícula de *E. coli* ATCC 29213 sin tratamiento; y **D.** Biopelícula de *E. coli* tratada con el AE de LOTC II. Las micrografías se presentan con un aumento de 8000x. Se señala con flechas rojas el efecto del AE LOTC II sobre la membrana celular.

La formación de biopelículas de cada cepa bacteriana sobre cupones de vidrio esmerilado pudo ser evidenciada mediante las micrografías SEM. En la **Figura 15A**, *S. aureus* formó aglomeraciones celulares adheridas a la superficie del vidrio como tapete, mientras que en la **Figura 15B**, se observó la reducción significativa de las aglomeraciones celulares y de la producción de exopolisacárido por efecto de la concentración subinhibitoria de LOTC II. Sin embargo, no se puede apreciar un efecto significativo sobre la estructura de la membrana celular *S. aureus*. En el

caso de la biopelícula formada por *E. coli*, la biopelícula observada en la **Figura 15C**, corresponde con una biopelícula con baja aglomeración de células, pero adherida a la superficie por una alta producción de exopolisacárido que las recubre. Estos resultados se relacionan con estudios previos (Cáceres *et al.*, 2020; Gomez-Sequeda *et al.*, 2020) donde se evidenciaron este tipo de biopelículas sobre superficies poliméricas. Sin embargo, en caso contrario a lo observado con *S. aureus*, LOTC II evidencia un efecto sobre la estructura de la membrana celular.

En la **Figura 15D**, se evidencia un efecto antibiopelícula significativo del AE sobre la formación de biopelículas de *E. coli*. Además, se observa un cambio morfológico en la membrana sobre las células que lograron adherirse, como hinchamiento, alargamiento y una apariencia rugosa o total destrucción de la membrana. Algunos estudios han evidenciado que compuestos derivados de plantas como el carvacrol y el timol pueden generar alteraciones en las membranas externas de las bacterias, lo cual daría como resultado el deterioro del potencial de membrana, disipación de gradientes pH, fuga de metabolitos y por último muerte celular (Olasupo *et al.*, 2003; Miladi *et al.*, 2017). Los AE podrían intercalarse entre los lípidos de la membrana bacteriana interactuando con el núcleo hidrofóbico de las bicapas lipídicas y alterar las propiedades fisicoquímicas de las membranas, la alteración de las membranas bacterianas podría afectar la producción de exopolisacárido en bacterias Gram positivas y la capacidad de adhesión en las Gram negativas (Ozkan y Erdogan, 2012; Bouyahya *et al.*, 2019; Lins *et al.*, 2019). El efecto de LOTC II sobre la membrana de *E. coli* y *S. aureus*, fue evidenciado mediante el estudio de la transición de fase termotrópica de dos sistemas lipídicos sintéticos representativos de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estos experimentos como parte del proyecto marco demostraron que LOTC II en

concentraciones subinhibitorias se intercala entre los lípidos de la cadena acil generando un aumento en la temperatura de transición de fase. Por otra parte, en el modelo Gram positivo, el efecto de LOTC se relacionó con la capacidad de afectar la fluidez de los liposomas. El efecto del AE sobre las membranas de los microorganismos dependerá de la carga superficial neta de la membrana, por lo cual, la membrana de bacterias Gram positivas estará mas cargada negativamente en comparación con la superficie zwitteriónica de bacterias Gram negativas.

Los resultados obtenidos en el estudio SEM, podrían evidenciar un posible efecto sobre la fluidez de la membrana de *S. aureus* lo reduciría su capacidad de formar biopelículas y producir exopolisacarido. Mientras que en *E. coli* se podría evidenciar un colapso de la membrana citoplasmática que generaría alteraciones en la distribución de la biopelícula y la capacidad de adhesión bacteriana.

8.6 Obtención de biomasa de biopelículas tratadas y no tratadas con el AE de LOTC II

El escalado se realizó para garantizar obtener una mayor biomasa de biopelículas de cada cepa, la cual se iba a ver disminuida por el tratamiento con el AE. Inicialmente se realizaron cinéticas de inhibición de una concentración sub-CMIB de LOTC II sobre células planctónicas y sésiles en los biorreactores. Lo anterior, para garantizar que no se afectaran las condiciones de cultivo en el biorreactor. De esta manera, se corroboró en el sistema de biorreactores no alteraba los resultados

obtenidos en la actividad antibacteriana y antiopelícula. En la Figura 16 se muestran las cinéticas de inhibición de LOTC II en biorreactores de 50m.

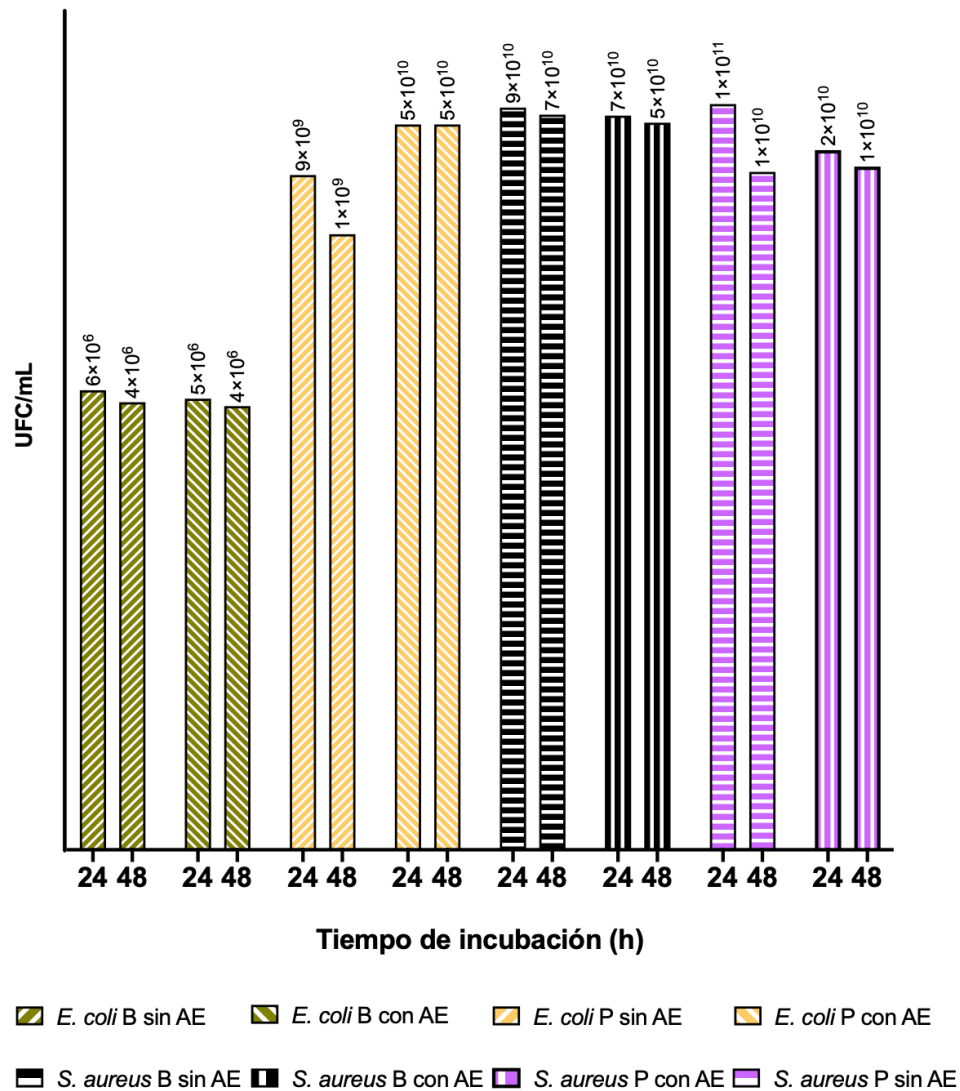


Figura 16. Evaluación del efecto inhibitorio de LOTC II a 0,37 mg/mL sobre las células planctónicas y sésiles inoculadas en biorreactores de 50 mL con medio LB para *E. coli* y TSBg 2% para *S. aureus*, en 24 y 48 h. El biorreactor contó con control de temperatura (37°C), burbujeo e intercambio de gases.

Se logró obtener una cantidad considerable de biomasa de biopelícula tratada y no tratada con el AE en cada cepa. Cada experimento se realizó por duplicado para cada condición (tratadas y no tratadas) en células planctónicas y de biopelícula. Por lo cual, se obtuvieron un total de 16 muestras (8 muestras de cada cepa) para realizar la extracción de ARN total.

8.7 Extracción de ARN total

Se realizó la extracción de ARN total de las muestras de biomasa tratadas y no tratadas con una concentración sub-CMIB de LOTC II de 0,37 mg/mL. Todas las muestras fueron extraídas a las 24 h de incubación en los biorreactores. En la **Tabla 10** se muestran las características del ARN total extraído de cada muestra, cuya calidad y concentración fue evaluada en un espectrofotómetro de UV-vis de microvolúmenes (IMPLEN NanoPhotometer NP80).

Tabla 10. Evaluación de la concentración y calidad del ARN total extraído de las muestras tratadas y no tratadas con el AE de LOTC II.

Condición de la muestra	Concentración (ng/μL)	Absorbancia (260/280)
<i>E. coli</i> planctónico sin tratamiento (EPST)	63	1,99
<i>E. coli</i> planctónico con tratamiento (EPCT)	58	2,02

<i>E. coli</i> biopelícula sin tratamiento (EBST)	49	2,1
<i>E. coli</i> biopelícula con tratamiento (EBCT)	43	1,98
<i>S. aureus</i> planctónico sin tratamiento (SPST)	120	2,0
<i>S. aureus</i> planctónico sin tratamiento (SPCT)	100	1,98
<i>S. aureus</i> biopelícula sin tratamiento (SBST)	97	2,01
<i>S. aureus</i> biopelícula con tratamiento (SBCT)	80	2,0

8.8 Diseño de *primers*

Se realizó el diseño de *primers* mediante softwares bioinformáticos, los cuales permitieron seguir los criterios establecidos para el diseño de cebadores (longitud del primer, temperatura de anillamiento, proporción G:C, entre otros). Por medio del software SnapGene y SnapGene viewer se pudieron correr qPCR virtuales analizando la calidad de los cebadores diseñados. La evaluación bioinformática mostró una alta especificidad de los *primers* para cada microorganismo evaluado

generando los amplicones esperados. Además, el software no mostró ninguna probabilidad de formar horquillas o dímeros entre cada uno de los cebadores. Se citan los *primers* que ya han sido usados por otros autores en estudios anteriores. Los genes diana se seleccionaron de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada en las **Tablas 4-5** y de acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad biológica de LOTC II. Los genes seleccionados están involucrados directamente con la regulación del sistema QS, la formación de biopelículas y la virulencia de *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 11. Lista de genes y sus respectivos cebadores para la evaluación del efecto del AE de LOTC II sobre el transcriptoma de *E. coli* y *S. aureus* durante la comunicación QS y la formación de biopelículas.

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto	Tm °C	% G-C	Referencias
Cebadores <i>E. coli</i>						
<i>sdiA</i>	SdiA 1	CGGTGCTGAACCCTGAA	177	59.3	58.8	
	SdiA 2	CGCTGCAACGGGAAAA		60.5	56.2	
<i>luxS</i>	LuxS 1	TGTTGCTGATGCCTGGAA	194	59.9	50.0	
	LuxS 2	CTTTCGGCAGTGCCAGTT		60.0	55.6	
<i>fimH</i>	FimH 1	GGCTGCGATGTTTCTGCT	105	60.1	55.6	
	FimH 2	CCCCAGGTTTTGGCTTTT		59.9	50	
<i>csgD</i>	csgD 1	CCGTACCGCGACATTGA	91	60.2	58.8	
	csgD 2	CGCCTTGCAACCCATT		59.1	56.2	
<i>ariR</i>	ariR 1	TGTTAGGGCAGGCTGTCA	149	58.9	55.6	

	ariR 2	TCGCAACACGATTTCCAG		59.3	50.0	
<i>pgaC</i>	pgaC 1	TTGATGGCGATGCGTTATTA	153	60.1	40	
	pgaC 2	GGAATACTCGCCAACCTGAA		60.1	50	
<i>qseC</i>	qseC 1	ACCCACGACGGCAGAAT	88	60.1	58.8	
	qseC 2	GCCCGTCAGCAAAACCT		59.8	58.8	
RNAr	rssA 1	AGGTGATCCGCCCGATA	130	60.0	58.8	
	rssA 2	CGGCAAAAGTTCGTCCA		59.3	52.9	
Cebadores <i>S. aureus</i>						
<i>hla</i>	Hla 1	GGCCTTATTGGTGCAAATGT	176	59.8	45	Jacuet <i>et al.</i> , 2019; Tuttobene <i>et al.</i> , 2020; Yeo <i>et al.</i> , 2020
	Hla 2	CCATATACCGGGTCCAAGA		59.6	50	
<i>agrA</i>	agrA 1	CAACCACAAGTTGTTAAAGCAG	173	57.6	40.9	
	agrA 2	TCGTTGTTTGCTTCAGTGATTC		60.3	40.9	
<i>RNAIII</i>	RNAIII		188			Wang <i>et al.</i> , 2021; Divyakolu <i>et al.</i> , 2021
	1	CATGGTTATTAAGTTGGGATGGC		58.31	43.48	
	RNAIII	GAAGGAGTGATTTCAATGGCACA		60.02	43.48	
<i>icaA</i>	icaA 1	GAGGTAAAGCCAACGCACTC	151	59.70	55	Atshan <i>et al.</i> , 2013; Mahmoudi <i>et al.</i> , 2019
	icaA 2	CCTGTAACCGCACCAAGTTT		59.18	50	
<i>icaD</i>	icaD 1	ACCCAACGCTAAAATCATCG	211	56.99	45	Atshan <i>et al.</i> , 2013;
	icaD 2	GCGAAAATGCCCATAGTTTC		56.16	45	

						Mahmoudi <i>et al.</i> , 2019
<i>aur</i>	Aur 1	ACCGTGTGTTAATTCGTGTGCTA	65	61.33	43.49	Kalinka <i>et al.</i> , 2014
	Aur 2	ATGGTCGCACATTCACAAGTTT		59.90	40.91	
<i>sarA</i>	SarA 1	GTAATGAGCATGATGAAAGAACTGT	111	58.44	36	Demirci <i>et al.</i> , 2021
	SarA 2	CGTTGTTTGCTTCAGTGATTTCG		59.53	45.45	
<i>rbf</i>	Rbf 1	AACCACCTAACTGATGTTATAC	156	53.77	36.36	Ma <i>et al.</i> , 2017
	Rbf 2	GACAACTTGACTGTTCTTATTC		53.59	36.36	
RNAr	Nuc 1	AATATGGACGTGGCTTAGCGT	197	60.38	47.62	
	Nuc 2	TTGACCTGAATCAGCGTTGTCTT		61.28	43.48	

8.9 Evaluación de la amplificación de los cebadores por RT-qPCR

Se evaluó la especificidad de los cebadores sintetizados sobre muestras de células planctónicas de *E. coli* y *S. aureus* mediante RT-qPCR. La calidad de los amplicones se evaluó por electroforesis en gel de agarosa. Cada uno de los genes evaluados amplificó específicamente con los *primers* sintetizados. En la **Figura 17** se muestran los picos de amplificación de cada uno de los genes evaluados en *E. coli* y *S. aureus*. En la **Figuras 18 y 19** se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los genes evaluados en *E. coli* y *S. aureus*. Cada experimento se realizó por triplicado con su respectivo control negativo.

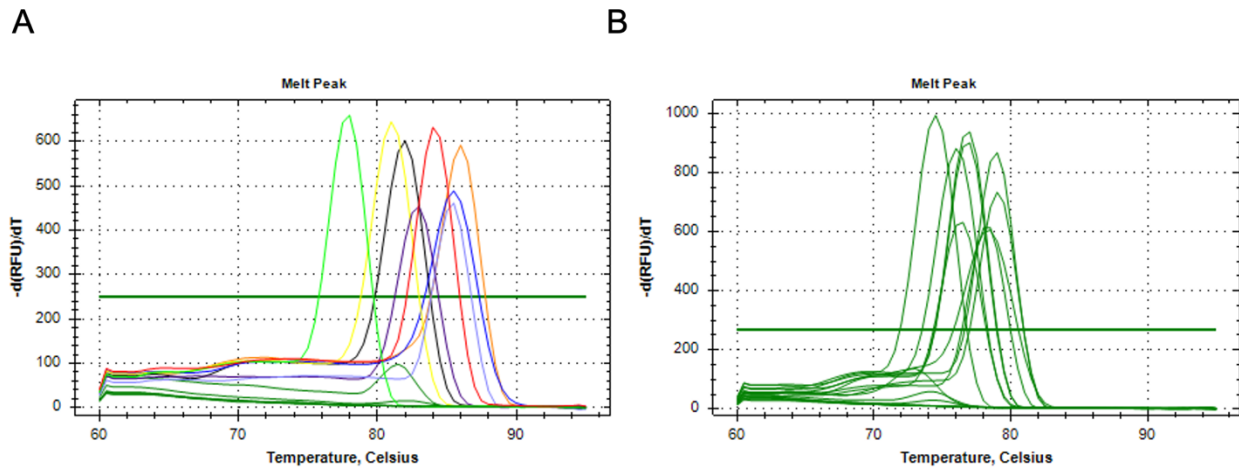


Figura 17. Picos de amplificación de los genes evaluados en muestras planctónicas por RT-qPCR. **A.** Ocho genes evaluados en *E. coli* ATCC 25922; **B.** Nueve genes evaluados en *S. aureus* ATCC 29213. Cada experimento se realizó por duplicado con su respectivo control negativo.

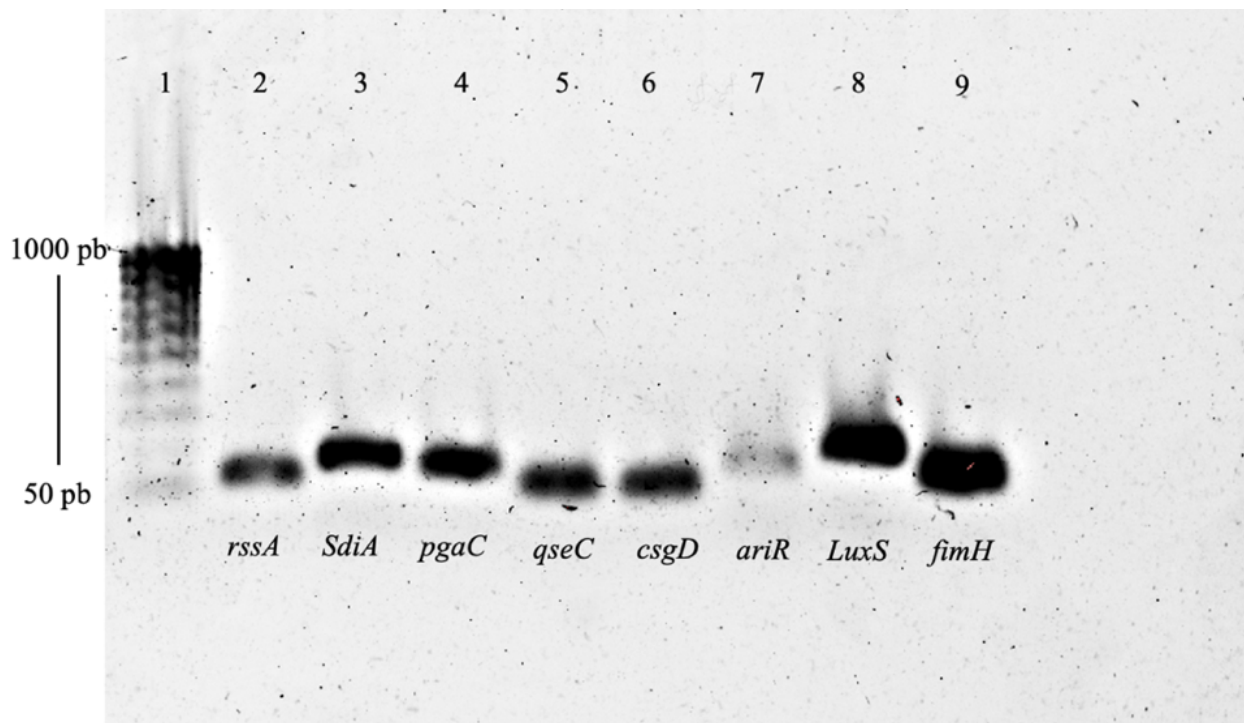


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos por RT-qPCR en *E. coli* ATCC 25922. Se observa una única banda de amplificación en cada gen evaluado. Carriles: 1. Marcador de peso molecular de 50-1000 pb, 2. *rssA*, 3. *PgaC*, 4. *qseC*, 5. *csgD*, 6. *ariR*, 7. *LuxS*, 8. *fimH*.

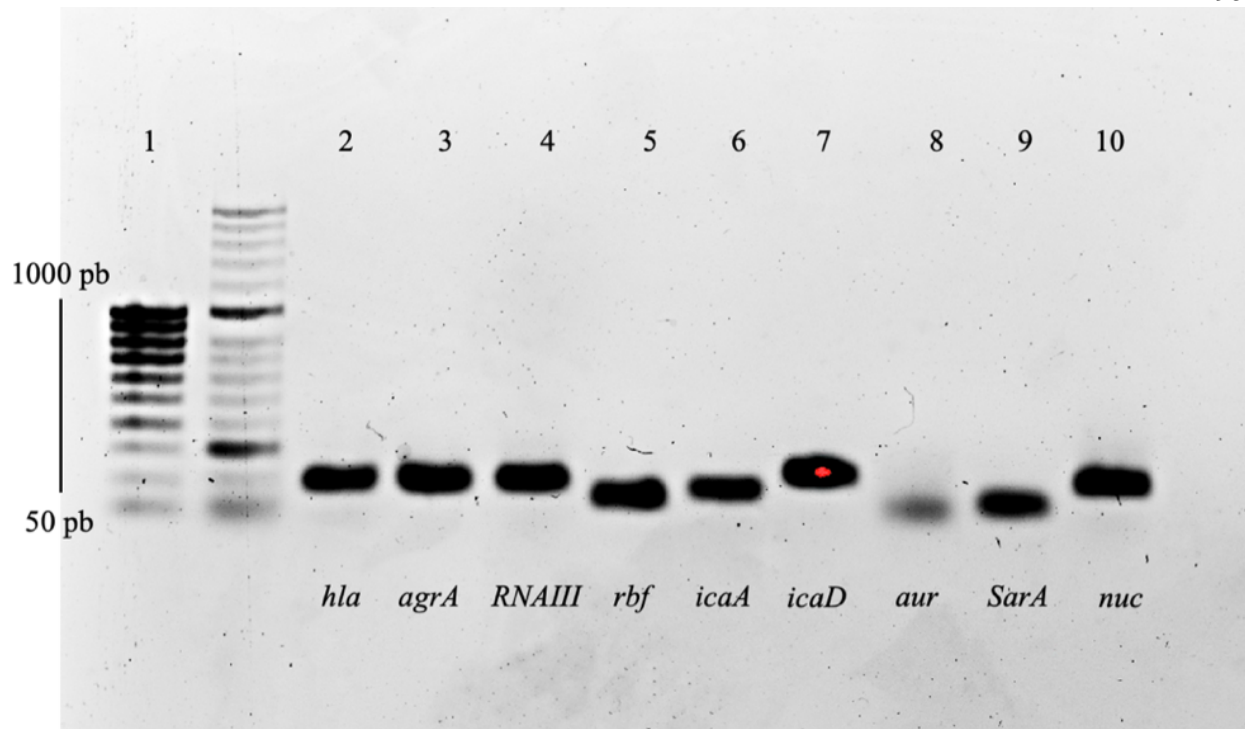


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos por RT-qPCR en *S. aureus* ATCC 29213. Se observa una única banda de amplificación en cada gen evaluado. Carriles: 1. Marcador de peso molecular de 50-1000 pb, 2. *hla*, 3. *agrA*, 4. *RNAlII*, 5. *rbf*, 6. *icaA*, 7. *aur*, 8. *SarA*, 9. *nuc*.

8.10 Análisis de expresión diferencial de genes durante la comunicación QS y la formación de biopelículas

Para determinar el posible mecanismo de acción de LOTC II sobre la inhibición de la comunicación QS y la formación de biopelículas en *E. coli* y *S. aureus* se realizó el análisis de la expresión diferencial de genes específicos por RT-qPCR. El umbral del ciclo calculado (CT) de cada gen se normalizó de acuerdo con el CT de los genes *housekeeping*. Se calcularon los cambios en la expresión génica (*fold change*) de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los resultados mostraron diferencias significativas entre las muestras tratadas y no tratadas

con el AE en cada microorganismo evaluado. Las curvas estándar de amplificación para cada gen se muestran en anexos.

8.10.1 Análisis de expresión diferencial de genes en *E. coli*

Para comprender los mecanismos moleculares detrás del papel inhibitor de LOTC II sobre la biopelícula de *E. coli* ATCC 25922 se evaluaron algunos genes involucrados en la motilidad (*csgD*, *fimH*, *qseC*), comunicación QS (*LuxS*, *SdiA*), síntesis de proteínas de membrana y exopolisacárido (*pgaC*), virulencia y colonización (*qseC*), resistencia al estrés ácido y formación de biopelículas (*ariR*) por RT-qPCR. En la **Figura 20** se muestra la expresión relativa de los genes evaluados por efecto del AE de LOTC II en células planctónicas y sésiles.

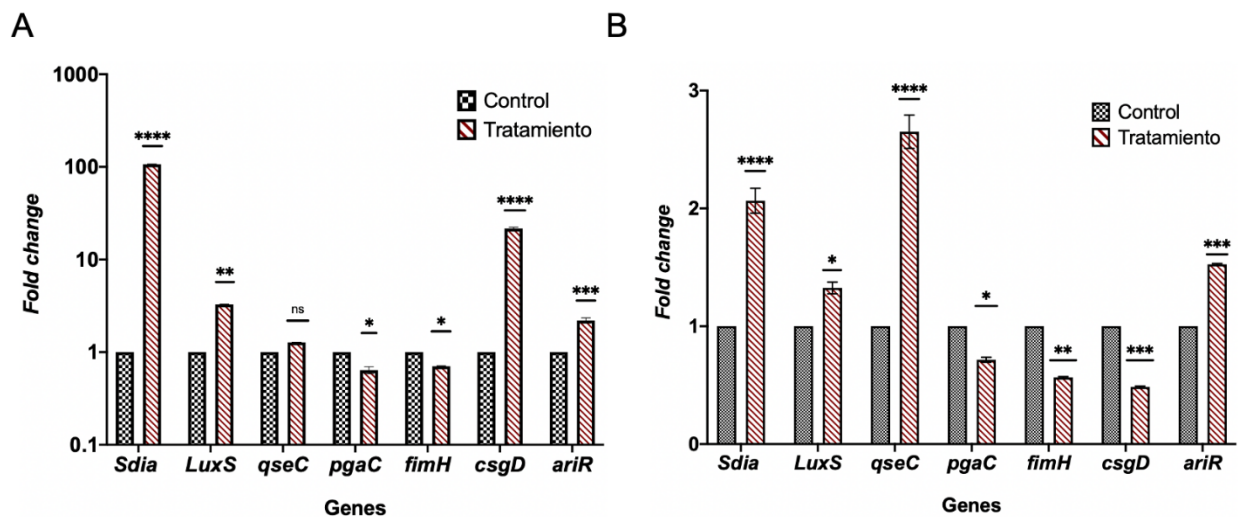


Figura 20. Perfiles transcripcionales de *E. coli* ATCC 25922 en estado planctónico (A) y en biopelícula (B) tratadas con o sin LOTC II. La expresión relativa de los genes diana fue normalizada al gen de referencia. Los datos representan los niveles transcripcionales después del tratamiento con el AE vs controles no tratados en 24 h de incubación. Las diferencias estadísticas son indicadas con un asterisco (* $p < 0.05$).

En este estudio se evidenció la regulación negativa en la expresión de los genes *fimH* y *csgD*, involucrados en la motilidad celular, agregación celular y adhesión de células a superficies por medio del curli. Las primeras etapas en la formación de biopelículas en *E. coli* requieren la síntesis de diferentes apéndices de la superficie bacteriana, incluidos los flagelos, que permiten la unión irreversible a la superficie (Prüß *et al.*, 2016). En este sentido los orgánulos adhesivos como las fimbrias curli, codificadas por el operón *csg*, y las fimbrias de tipo I, codificadas por genes *fim* son especialmente importantes. Por otra parte, la motilidad celular es un mediador de las interacciones célula-célula y actúa como factor determinante de la arquitectura de la biopelícula (Wood *et al.*, 2006). Por lo mencionado anteriormente, la motilidad y la síntesis de fimbrias-flagelos serían un factor clave en el desarrollo de la comunicación QS y formación de biopelículas en *E. coli*. Después de la unión irreversible a la superficie, es necesaria la coproducción de polímeros polisacáridos y curli para el buen desarrollo de la biopelícula (Prüß *et al.*, 2016).

Los genes para la formación del curli están organizados en dos operones divergentes: *csgBA*, que codifica componentes estructurales y *csgDEFG* que codifica proteínas para el ensamblaje y transporte de curli. La expresión de los dos operones está bajo el control de la proteína *csgD*, el primer producto génico del operon *csgDEFG*. Adicionalmente, la proteína CsgD es el modulador maestro de la expresión de un conjunto de genes para la adaptación de la fisiología celular al estado de biopelícula (Brombacher *et al.*, 2006; Ogasawara *et al.*, 2020). En el caso de las fimbrias tipo I, conocidas también como pilis de fijación, son comúnmente usadas por las bacterias como estructuras de adherencia con el fin de resistir las fuerzas de cizallamiento. En el *E. coli*, las fimbrias tipo I portan la subunidad adhesiva FimH, altamente conservada, como responsable del

mantenimiento de la estructura. El dominio fimH es el responsable principal de la adherencia, paso principal en la colonización y la formación de biopelículas (Yoshida *et al.*, 2021). Lo anterior mencionado se relaciona con la actividad antimotilidad determinada en los ensayos de actividad biológica del AE de LOTC II, lo cual sugiere que la pérdida de motilidad y afectación del curli influyen significativamente en la inhibición de la formación de biopelículas en *E. coli*, al no permitir la interacción célula-superficie, célula-célula y bloqueando la agregación celular. En el estudio realizado por Zuberi y col., se comprobó que la delección del gen *fimH* bloqueó la producción de la subunidad fimH de las fimbrias de *E. coli*, reduciendo considerablemente su capacidad de formación de biopelículas (Zuberi *et al.*, 2017).

Por otra parte, se evidenció la regulación negativa en la expresión del gen *pgaC*, gen involucrado en las rutas de síntesis y exportación del exopolisacárido. En el mantenimiento de la biopelícula de *E. coli* es importante la producción del homopolímero lineal poli- β -1,6-N-acetil glucosamina (PGA), que sirve como adhesina de estructura y estabilidad de la biopelícula. La producción de PGA requiere los productos génicos del operon *pgaABDC*, los cuales son necesarios para la maduración de la biopelícula (Shrestha *et al.*, 2019). La proteína PgaC es una glucosiltransferasa que es indispensable en la producción de PGA. En este sentido, Itoh y col., demostraron que la delección del gen *pgaC* bloqueaba la producción de PGA, inhibiendo la formación y mantenimiento de la biopelícula (Itoh *et al.*, 2020). En este sentido, la regulación negativa en la expresión de *pgaC* por efecto de LOTC II, afectó significativamente la producción de exopolisacárido, inhibiendo significativamente la formación de biopelículas y la agregación celular, efecto claramente evidenciado en los análisis SEM.

Un resultado interesante encontrado fue la regulación positiva en la expresión del gen *ariR*, gen importante en las rutas de resistencia a cambios ambientales. Un componente importante en el crecimiento sésil de *E. coli* es la proteína de resistencia a los ácidos AriR. La proteína AriR es importante en la colonización de *E. coli* del sistema digestivo y se ha identificado a través de estudios de perfiles transcriptómicos que está involucrada en la regulación de la comunicación celular y el desarrollo de biopelículas (Attila y Wood, 2009; Wood 2009). Estudios fenotípicos mostraron que AriR reprime la formación de biopelículas en un medio bajo estrés, disminuye la motilidad celular y protege a la célula del ácido. Estos datos fenotípicos están potencialmente mediados a través de interacciones de señales AI-2 (LuxS) e indol, lo que sugiere que AriR es un regulador transcripcional no específico (Wood, 2009). Por lo tanto, la sobreexpresión del gen *ariR* influiría en la resistencia de *E. coli* al cambio de pH en el medio, por efecto de LOTC II y a su vez inhibiendo la motilidad y la formación de biopelículas.

En relación con los genes relacionados con los mecanismos de comunicación celular, se evidenció la regulación positiva en la expresión de los genes *LuxS* y *qseC*. Los mecanismos de comunicación celular son importantes en la formación de biopelículas de *E. coli*. El sistema principal de comunicación QS en *E. coli* es el sistema AI-2, donde la producción del autoinductor 2 (burato-furanoilo) está regulado por la proteína LuxS (Yao *et al.* 2006). El sistema AI-2 estimula la formación de biopelículas y cambia su estructura al estimular la motilidad flagelar a través del regulador de motilidad de QS MqsR. A su vez, el regulador de motilidad MqsR actúa a través del sistema regulador de motilidad de dos componentes QseBC. Por lo tanto, el sistema de dos

componentes regulador de motilidad QseBC afectaría transcripcionalmente la expresión de genes de motilidad celular (Whiteley *et al.*, 2017; Jani *et al.*, 2017). Adicionalmente, Yang y col., determinaron que el sensor histidin quinasa QseC, regulador de la proteína de respuesta QseB, tiene un papel en la formación de biopelículas a través del reconocimiento Epinefrina-Norepinefrina (EPI-NE), sistema adicional de comunicación celular en *E. coli* (yang *et al.*, 2014). En este sentido *E. coli* podría estar intentando regular sus mecanismos de motilidad a través de la regulación de *qseC*, sin embargo, tendría que confirmarse la afectación de esta ruta mediante el estudio de cambios de expresión en el gen *qseB*.

Por otra parte, evidenciamos la regulación positiva en la expresión del gen *SdiA*, un regulador transcripcional asociado a la comunicación QS. *E. coli* codifica una proteína activadora de la transcripción, un receptor homólogo de LuxR, conocido como inhibidor del supresor de división SdiA. Aunque *E. coli* no es capaz de sintetizar moléculas AHL, SdiA es capaz de reconocer moléculas autoinducidas producidas por otras bacterias. Se ha comprobado que *E. coli* usa la proteína SdiA para reducir la formación de biopelículas reconociendo señales QS e indol. En estudios recientes, Lee y col., determinaron que SdiA redujo la formación de biopelículas al reprimir genes relacionados con la síntesis de curli y rutas asociadas al indol. Estos resultados sugirieron que *E. coli* puede regular la expresión de *SdiA* para disminuir la formación de biopelículas dependiendo de la alteración de sensores de señal (Lee *et al.*, 2009). Corroborando lo mencionado anteriormente, Culler y col., demostraron que SdiA es activo y funcional en presencia o ausencia de moléculas AHL. Además, puede detectar diferentes condiciones ambientales, como la osmolaridad y la temperatura, lo que le permitiría a *E. coli* regular sistemas de respuesta al estrés

(Culler et al., 2018). En estudios previos, Kim y col., demostraron la interacción entre SdiA y el promotor de división celular *ftsQP2*, como respuesta al estrés en ausencia de moléculas inductoras (Kim *et al.*, 2014). Por lo tanto, la regulación positiva en la expresión de *sdiA* con respuesta al efecto del AE de LOTC II, afectaría significativamente mecanismos de motilidad y formación de biopelículas como inhibidor transcripcional.

8.10.2 Análisis de expresión diferencial de genes en *S. aureus*

Para comprender la regulación transcripcional de la biopelícula de *S. aureus* ATCC 29213 por efecto de LOTC II, se evaluaron genes relacionados con las rutas de comunicación QS (*RNA III*, *agrA*), síntesis de polímeros del exopolisacárido (*icaA*, *icaD*), virulencia y colonización (*hla*), proteasas extracelulares (*aur*), reguladores globales de formación de biopelículas (*sarA*, *rbf*) por RT-qPCR. En la **Figura 21** se muestra la expresión relativa de los genes evaluados por efecto del AE de LOTC II en células planctónicas y sésiles.

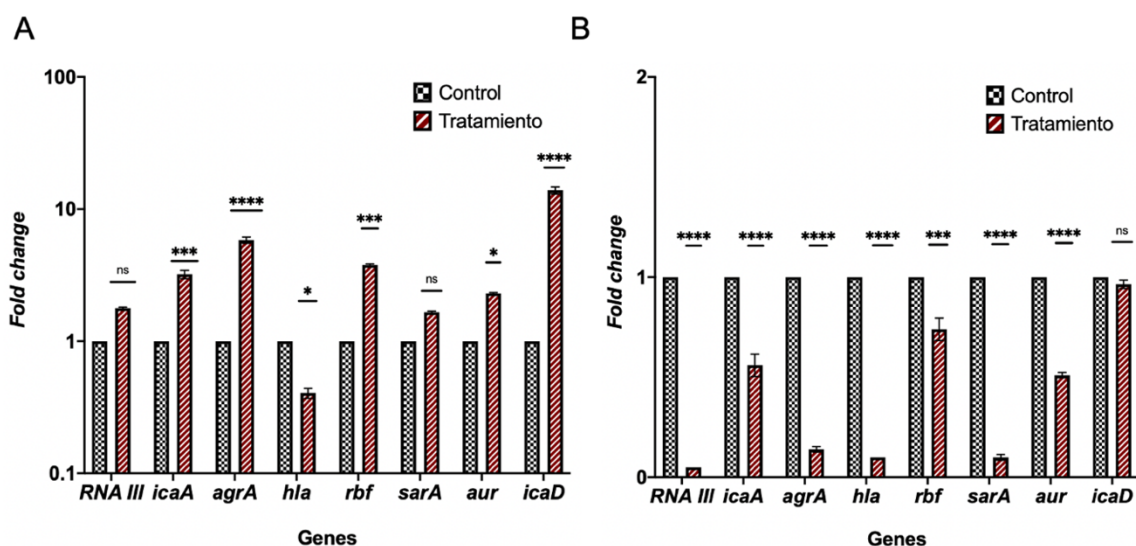


Figura 21. Perfiles transcripcionales de *S. aureus* ATCC 29213 en estado planctónico (A) y en biopelícula (B) tratadas con o sin LOTC II. La expresión relativa de los genes diana fue normalizada al gen de referencia. Los datos representan los niveles transcripcionales después del tratamiento con el AE vs controles no tratados en 24 h de incubación. Las diferencias estadísticas son indicadas con un asterisco (* $p < 0.05$).

En este estudio se evidenció la regulación negativa en la expresión del gen *icaA* y no se observaron cambios significativos en la expresión del gen *icaD*. La regulación de *icaA* e *icaD* está involucrada en la síntesis y exportación de adhesinas y exopolisacárido. La formación de biopelículas en *S. aureus* es un proceso multifactorial que está influenciado por diferentes factores; entre los más importantes, se encuentra el polisacárido intercelular adhesina (PIA). Aunque se han descrito diferentes polisacáridos candidatos, se ha determinado que el principal determinante de la fase de acumulación de la formación de biopelículas en *S. aureus* es la PIA. Los estudios de composición han demostrado que PIA consiste en N-acetilglucosamina polimérica y por esta razón se nombra PIA/PNAG (Chen *et al.*, 2020). Las enzimas necesarias para la síntesis de la matriz de exopolisacárido PIA/PNAG están codificadas dentro del operón *icaADBC*, cuya mutación resulta en la capacidad reducida de formar biopelículas (Avila-Novoa *et al.*, 2018). La producción de matriz de exopolisacárido (PIA/PNAG) de *S. aureus* está vinculada a la etapa de adhesión irreversible. Dentro del operón *icaADBC*, los genes *icaA* e *icaD* están directamente relacionados con la producción de PNAG y del agrupamiento celular en múltiples capas, *icaB* codifica para una proteína de estabilidad de la matriz de exopolisacárido y, por último, *icaC* codifica una proteína receptora de polisacáridos. La activación de la expresión del operón *icaADBC* está influenciada por la regulación negativa de *icaR* y la activación del sistema *agr* (Fitzpatrick *et al.*, 2005; Hoang *et al.*, 2019). La transcripción de *icaADBC* también está sujeta a la regulación positiva del factor de regulación global *sarA* (Jeng *et al.*, 2008).

También se evidenció la regulación negativa en la expresión del gen *sarA*, un regulador transcripcional importante en diferentes rutas de resistencia ambiental. El locus *sarA*, codifica una proteína de unión al ADN, que se requiere en algunas condiciones de crecimiento como la formación de biopelículas. Estudios previos (Beenken *et al.*, 2003; Valle *et al.*, 2003) demostraron que la mutación de *sarA*, da como resultado la capacidad reducida para formar biopelículas, una transcripción reducida del operón *icaADBC* y una capacidad reducida de producir PNAG. En estudios previos, Valle y col., demostraron que la regulación negativa de los genes *icaA* e *icaD*, incluso solo del gen *icaA*, resultó en la reducción significativa de producción de biopelículas en *S. aureus* (Valle *et al.*, 2019).

Por otra parte, se evidenció la regulación negativa en la expresión del gen *agrA*, gen importante en las redes de regulación QS y rutas de asociadas al exopolisacárido. En el desarrollo de las biopelículas de *S. aureus* es importante la producción de Componentes Microbianos de la Superficie que Reconocen Moléculas de Matriz Adhesiva (MSCRAMM). La producción de estos factores es un paso fundamental en el establecimiento de las biopelículas y permite su desarrollo y maduración (Blevins *et al.*, 2002; Foster, 2019). La producción de MSCRAMM está influenciada por los elementos regulatorios globales *agr* y *sarA*. Se ha demostrado que mutaciones en *agr* resultan en mayor producción de biopelículas mientras que mutaciones en *sarA* inhiben la formación de biopelículas (Bennken *et al.*, 2003; Arora *et al.*, 2020). El locus *agr* codifica un sistema QS de dos componentes que modula la producción de un regulador transcripcional (RNA III) y la autorregulación del sistema *agr*. También se evidenció la regulación negativa en la expresión del gen *RNA III*, un importante regulador que es responsable de la regulación postranscripcional de múltiples factores de virulencia, que median un cambio de la expresión de

proteínas asociadas a la superficie celular y toxinas extracelulares como la alfa-hemolisina (*hla*) y la delta-hemolisina (*hld*) (Caballero *et al.*, 2018). Caiazza y col., demostraron que la síntesis de alfa-hemolisina (*hla*) era necesario para la formación de biopelículas, activando proteínas de adhesión (Caiazza *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2018). Por otra parte, también se ha asociado a la delta-hemolisina con la estabilidad de las biopelículas (mohammed y Al-Mathkhury *et al.*, 2018). La regulación negativa en la expresión del gen *hla* por efecto de LOTC II se evidenció en los experimentos de actividad antihemolítica sobre *S. aureus*, por lo cual, el efecto del AE LOTC II no solo se relaciona directamente con la síntesis de alfa-hemolisina, sino con la afectación de proteínas de reconocimiento de señal del QS, que dan como resultado la inhibición de reguladores transcripcionales, producción de toxinas y formación de biopelículas.

En el caso del sistema QS, se evidenció la regulación negativa en la expresión del gen *agrA*, gen que codifica una proteína indispensable en el reconocimiento de señales QS y que actúa como regulador transcripcional de diferentes características bacterianas en *S. aureus*. Estudios previos demostraron que las cepas que expresan *agr* en niveles altos tendrían una capacidad reducida de formar biopelículas, es decir que en *S. aureus* la inactivación del sistema QS sería necesaria para el establecimiento de la biopelícula (Vuong *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2018). Sin embargo, *agrC* y *agrA* comprenden un sistema clásico de transducción de señales de dos componentes, donde *agrC* unido al ligando, activa al regulador de respuesta de unión al ADN *agrA*. Los dímeros activos de *AgrA* se unen a la región intergénica de *agr* y regulan positivamente la expresión de los dos operones. Además, *AgrA* regularía de forma independiente la expresión de modulinas solubles en fenol citolítico (PSM) y diversos genes relacionados con el metabolismo (Derakhshan *et al.*, 2021).

La formación de biopelículas en *S. aureus* no solo está mediada por la producción de PIA/PNAG, sino que pueden existir biopelículas independientes de *icaADBC*, por la regulación de la proteína asociada a la biopelícula Bap. La regulación de la biopelícula dependiente de Bap esta influenciada por reguladores globales como *rbf* (Morales *et al.*, 2020). En este estudio de investigación se evidenció la regulación negativa en la expresión de los genes *rbf* y *aur*, relacionados con rutas de producción de exopolisacárido proteico y proteasas extracelulares. Se ha propuesto que *rbf* está involucrado en la regulación positiva de proteínas importantes en la formación de biopelículas (Fang *et al.*, 2020). Lim y col., observaron que una cepa con una inserción en *rbf* se vio afectada en la formación de biopelículas en poliestireno y vidrio. Sin embargo, la cepa mutante no se vio afectada en la etapa de adhesión primaria, lo que sugiere que la inactivación de *rbf* afectó la etapa de agregación celular y no la de adhesión. Además, los resultados obtenidos sugirieron que *rbf* puede regular una vía independiente de *ica* (Lim *et al.*, 2004). Estos resultados fueron confirmados por Cue y col., quienes observaron que *rbf* inactivaría *icaR*, el represor de *icaADBC*, para mejorar la formación de biopelículas en *S. aureus*. Sin embargo, en la delección o inactivación de *icaADBC* es capaz de activar genes relacionados con la síntesis de proteínas para la conformación de un exopolisacárido proteico, mejorando la supervivencia bacteriana (Cue *et al.*, 2020). Por lo tanto, la inhibición en la formación de biopelículas de *S. aureus* por efecto del AE de LOTC II está relacionado con la afectación de exopolisacárido PIA y exopolisacárido proteico.

8.11 Posibles mecanismos de acción del AE de LOTC II durante la comunicación QS y la formación de biopelículas en *E. coli* y *S. aureus*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el posible mecanismo de acción del AE de LOTC II sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 está relacionado con la inhibición de la motilidad bacteriana (*fimH*), la agregación celular y adhesión a las superficies por medio del curli (*csgD*) y la inhibición de la síntesis y exportación de exopolisacárido (*pgaC*) y reguladores globales de biopelículas (*SdiA*, *AriR*) (Figura 22). Cada una de las rutas mencionadas anteriormente está directamente relacionada con las primeras etapas de la formación de biopelículas, por lo cual, el AE de LOTC II inhibe las biopelículas de *E. coli* en las primeras etapas de formación, sin embargo, podría inhibir las biopelículas ya formadas mediante la activación de inhibidores globales de biopelículas como *sdiA* y *AriR*. No se observó efecto sobre la regulación de genes relacionados con la producción de autoinductores del sistema QS, por lo cual, se recomiendan estudios enfocados sobre rutas de reconocimiento de autoinductores QS y reguladores transcripcionales del QS para establecer el efecto del AE de LOTC II sobre este mecanismo.

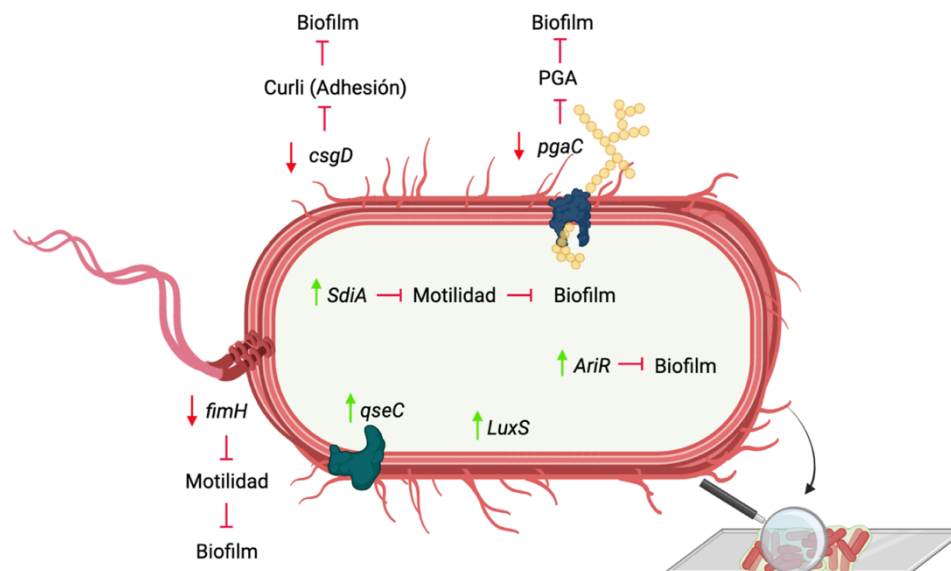


Figura 22. Posibles mecanismos antagonistas del AE de LOTC II sobre la formación de biopelículas de *E. coli* ATCC 25922.

Por otra parte, el posible mecanismo de acción del AE de LOTC II sobre *S. aureus* ATCC 29213 está relacionado con la inhibición de reguladores transcripcionales del QS (*agrA*), reguladores transcripcionales de producción de toxinas (*RNAIII*), producción de alfa hemolisina (*hla*), síntesis y exportación de PIA y PNAG (*icaA*, *icaD*), inhibición de proteínas reguladoras del exopolisacárido (*aur*, *rbf*) (**Figura 22**). Las rutas mencionadas anteriormente inhibidas por el efecto del AE de LOTC II están directamente relacionadas con la comunicación QS, la formación y mantenimiento de las biopelículas y la capacidad de colonización y patogenicidad de *S. aureus*. Por lo tanto, el AE de LOTC II podría inhibir la formación de biopelículas de *S. aureus* en sus primeras etapas y causar un desprendimiento de las biopelículas ya formadas.

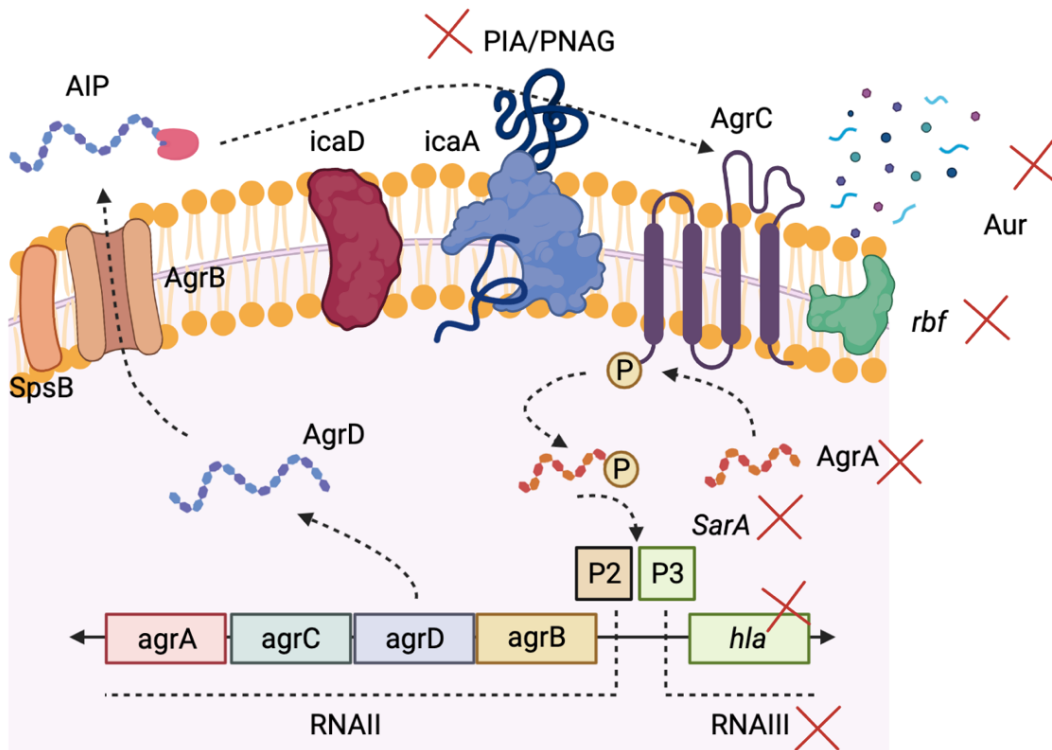


Figura 23. Posibles mecanismos antagonistas del AE de LOTC II sobre la formación de biopelículas de *S. aureus* ATCC 29213.

9. CONCLUSIONES

El AE de *Lippia origanoides* quimiotipo timol-carvacrol II tiene efecto antimicrobiano, antimotilidad, antihemólisis y antibiopelícula sobre *E. coli* ATCC 259922 y *S. aureus* ATCC 29213 en concentraciones subinhibitorias de 0,40 mg/mL.

EL AE de LOTC II produjo cambios significativos en la expresión de genes de *E. coli* ATCC 259922 y *S. aureus* ATCC 29213 relacionados con mecanismos de adhesión y motilidad celular, producción de exopolisacárido (PNG, PIA/PNAG), procesamiento de información ambiental, sistemas de dos componentes, transportadores ABC, proteínas de membrana y reguladores globales de transcripción, que en conjunto, podrían explicar el efecto antimicrobiano, antiQS y antibiopelícula de LOTC II en concentraciones subinhibitorias sobre ambos microorganismos.

El AE LOTC II ocasionó una regulación significativa, tanto positiva como negativa, en la expresión de genes relacionados con la comunicación celular QS, formación de biopelículas y rutas relacionadas de *E. coli* ATCC 259922 (*SdiA*, *pgaC*, *csgD*, *fimH*, *ariR*, *qseC*, *LuxS*) y *S. aureus* ATCC 29213 (*agrA*, *icaA*, *icaD*, *hla*, *rbf*, *sarA*, *RNA III*, *aur*) confirmando la hipótesis planteada en este estudio.

Mediante la correlación de los cambios en la expresión diferencial de genes con las rutas metabólicas relacionadas, se determinó que el posible mecanismo de acción del AE LOTC II sobre *E. coli* ATCC 259922 y *S. aureus* ATCC 29213 está relacionado con la inhibición de componentes importantes en la motilidad, adhesión a superficies, agregación celular, producción de

exopolisacárido y reguladores transcripcionales de la comunicación QS y formación de biopelículas.

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron identificar posibles mecanismos de acción de LOTC II sobre la formación de biopelículas 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. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, J., Rafiq, Q. A., & Ratcliffe, E. (2018). Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Future science OA*, 4(4), FSO290.
- Alves, M., Gonçalves, M. J., Zuzarte, M., Alves-Silva, J. M., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., & Salgueiro, L. (2019). Unveiling the antifungal potential of two Iberian thyme essential oils: effect on *C. albicans* germ tube and preformed biofilms. *Frontiers in pharmacology*, 10, 446.
- Atshan, S. S., Shamsudin, M. N., Karunanidhi, A., van Belkum, A., Lung, L. T. T., Sekawi, Z., ... & Hamat, R. A. (2013). Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Infection, genetics and evolution*, 18, 106-112.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 397-409.
- Anderson-Glenna, M. J., Bakkestuen, V., & Clipson, N. J. (2008). Spatial and temporal variability in epilithic biofilm bacterial communities along an upland river gradient. *FEMS microbiology ecology*, 64(3), 407-418.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 397-409.
- Abebe, G. M. (2020). The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. *International journal of microbiology*, 2020.
- Águila-Arcos, S., Álvarez-Rodríguez, I., Garaiurrebaso, O., Garbisu, C., Grohmann, E., & Alkorta, I. (2017). Biofilm-forming clinical *Staphylococcus* isolates harbor horizontal transfer and antibiotic resistance genes. *Frontiers in microbiology*, 8, 2018.
- Al-Hussaini, R., & Mahasneh, A. M. (2009). Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules*, 14(9), 3425-3435.

- Abdellatif, H. A., Khalil, S. A., & Hegazy, A. (2018). Molecular Study on Bacterial Resistance to Antibiotic with Special Reference to Plasmid Curing. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 58(1).
- Al-Ani, A., Darton, R. J., Sneddon, S., & Zholobenko, V. (2017). Nanostructured Zeolites: The introduction of intracrystalline mesoporosity in basic faujasite-type catalysts. *ACS Applied Nano Materials*, 1(1), 310-318.
- Attila, C., Ueda, A., & Wood, T. K. (2009). 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(3), 525-533.
- Avila-Novoa, M. G., Iñíguez-Moreno, M., Solís-Velázquez, O. A., González-Gomez, J. P., Guerrero-Medina, P. J., & Gutiérrez-Lomelí, M. (2018). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food contact surfaces in the dairy industry of Jalisco, Mexico. *Journal of Food Quality*, 2018.
- Arora, S., Li, X., Hillhouse, A., Konganti, K., Little, S. V., Lawhon, S. D., ... & Hook, M. (2020). *Staphylococcus epidermidis* MSCRAMM SesJ is encoded in composite islands. *Mbio*, 11(1), e02911-19.
- Anderson, M. J., Schaaf, E., Breshears, L. M., Wallis, H. W., Johnson, J. R., Tkaczyk, C., ... & Peterson, M. L. (2018). Alpha-toxin contributes to biofilm formation among *Staphylococcus aureus* wound isolates. *Toxins*, 10(4), 157.
- Andersson, D. I. (2003). Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current opinion in microbiology*, 6(5), 452-456.
- Bhatt, V. S. (2018). Quorum sensing mechanisms in gram positive bacteria. In *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence* (pp. 297-311). Springer, Singapore.
- Bouyahya, A., Dakka, N., Et-Touys, A., Abrini, J., & Bakri, Y. (2017). Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(8), 729-743.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019). Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. *Journal of pharmaceutical analysis*, 9(5), 301-311.
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Talbau, A., Fella, H., Abrini, J., & Dakka, N. (2017). Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial pathogenesis*, 111, 41-49.
- Bowler, P., Murphy, C., & Wolcott, R. (2020). Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship?. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 1-5.
- Bhando, T., Dubey, V., & Pathania, R. (2019). Biofilms in Antimicrobial Activity and Drug Resistance. In *Bacterial Adaptation to Co-resistance* (pp. 109-139). Springer, Singapore.

- Bouyahya, A., Dakka, N., Et-Touys, A., Abrini, J., & Bakri, Y. (2017). Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(8), 729-743.
- Bączek, K. B., Kosakowska, O., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., Costa, R., Mondello, L., ... & Węglarz, Z. (2017). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Industrial Crops and Products*, 102, 154-163.
- Becker, J., Hackl, M., Rupp, O., Jakobi, T., Schneider, J., Szczepanowski, R., ... & Brinkrolf, K. (2011). Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. *Journal of biotechnology*, 156(3), 227-235.
- Brogan, D. M., & Mossialos, E. (2016). A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. *Globalization and health*, 12(1), 1-7.
- Bhatt, V. S. (2018). Quorum sensing mechanisms in gram positive bacteria. In *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence* (pp. 297-311). Springer, Singapore.
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J. D., Labadie, J. C., & Lebert, A. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 25(3), 225-232.
- Bar-Even, A., Noor, E., Flamholz, A., & Milo, R. (2013). Design and analysis of metabolic pathways supporting formatotrophic growth for electricity-dependent cultivation of microbes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(8-9), 1039-1047.
- Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in microbiology*, 19(9), 449-455.
- Berdejo, D., Pagán, E., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2019). Exploiting the synergism among physical and chemical processes for improving food safety. *Current Opinion in Food Science*, 30, 14-20.
- Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T., Woertman, J., & Veldhuizen, E. J. (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One*, 9(4), e93414.
- Borges, A., Lopez-Romero, J. C., Oliveira, D., Giaouris, E., & Simões, M. (2017). Prevention, removal and inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms using selected monoterpenes of essential oils. *Journal of applied microbiology*, 123(1), 104-115.
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C., & Landini, P. (2006). Gene expression regulation by the curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *Journal of bacteriology*, 188(6), 2027-2037.
- Blevins, J. S., Beenken, K. E., Elasri, M. O., Hurlburt, B. K., & Smeltzer, M. S. (2002). Strain-dependent differences in the regulatory roles of *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 70(2), 470-480.
- Beenken, K. E.; Blevins, J. S.; Smeltzer, M. S. (2003). Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* Limits Biofilm Formation. *Infection and Immunity*, 71(7), 4206–4211. doi:10.1128/IAI.71.7.4206-4211.2003

- Bowler, P., Murphy, C., & Wolcott, R. (2020). Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship?. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 1-5.
- Chandra, H., Bishnoi, P., Yadav, A., Patni, B., Mishra, A. P., & Nautiyal, A. R. (2017). Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials—a review. *Plants*, 6(2), 16.
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147.
- Carvalho, D. M., de Sá, P. H., Castro, T. L., Carvalho, R. D., Pinto, A., Gil, D. J., ... & Pacheco, L. G. (2014). Reference genes for RT-qPCR studies in *Corynebacterium pseudotuberculosis* identified through analysis of RNA-seq data. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(4), 605-614.
- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 11(3-4), 217-221.
- Costa, M. F., Durço, A. O., Rabelo, T. K., Barreto, R. D. S. S., & Guimarães, A. G. (2019). Effects of carvacrol, thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: A systematic review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(2), 141-155.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
- Cava-Roda, R., Taboada-Rodríguez, A., López-Gómez, A., Martínez-Hernández, G. B., & Marín-Iniesta, F. (2021). Synergistic Antimicrobial Activities of Combinations of Vanillin and Essential Oils of Cinnamon Bark, Cinnamon Leaves, and Cloves. *Foods*, 10(6), 1406.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food control*, 54, 111-119.
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147.
- Crueger, W., Crueger, A., 1993. *Biotechnologia: Manual de microbiologia industrial*. Zaragoza. Espanha. Editorial Acribia.
- Carbonell, X., Corchero, J. L., Cubarsí, R., Vila, P., & Villaverde, A. (2002). Control of *Escherichia coli* growth rate through cell density. *Microbiological research*, 157(4), 257-265.
- Croes, S., Deurenberg, R. H., Boumans, M. L. L., Beisser, P. S., Neef, C., & Stobberingh, E. E. (2009). *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC microbiology*, 9(1), 1-9.

- Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. (2015, October). The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 46, pp. 91-103). Academic Press.
- Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2003). Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 185(10), 3214-3217.
- Costa, M. F., Durço, A. O., Rabelo, T. K., Barreto, R. D. S. S., & Guimarães, A. G. (2019). Effects of carvacrol, thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: A systematic review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(2), 141-155.
- Culler, H. F., Couto, S. C., Higa, J. S., Ruiz, R. M., Yang, M. J., Bueris, V., ... & Sircili, M. P. (2018). Role of SdiA on biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Genes*, 9(5), 253.
- Chen, Q., Xie, S., Lou, X., Cheng, S., t, X., Zheng, W., ... & Wang, H. (2020). Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *Microbiologyopen*, 9(1), e00946.
- Caballero, C. J., Menendez-Gil, P., Catalan-Moreno, A., Vergara-Irigaray, M., García, B., Segura, V., ... & Toledo-Arana, A. (2018). The regulon of the RNA chaperone CspA and its auto-regulation in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic acids research*, 46(3), 1345-1361.
- Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2003). Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 185(10), 3214-3217.
- Cue, D., Lei, M. G., Luong, T. T., Kuechenmeister, L., Dunman, P. M., O'Donnell, S., ... & Lee, C. Y. (2009). Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of *icaR*, a negative regulator of *icaADBC*. *Journal of bacteriology*, 191(20), 6363-6373.
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and drug resistance*, 12, 3903.
- David, M. Z., & Daum, R. S. (2017). Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Staphylococcus aureus*, 325-383.
- Dang, H., & Lovell, C. R. (2016). Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(1), 91-138.
- Duta, L., Ristoscu, C., Stan, G. E., Husanu, M. A., Besleaga, C., Chifiriuc, M. C., ... & Mihailescu, I. N. (2018). New bio-active, antimicrobial and adherent coatings of nanostructured carbon double-reinforced with silver and silicon by Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation for medical applications. *Applied Surface Science*, 441, 871-883.
- Diniz do Nascimento, L., Moraes, A. A. B. D., Costa, K. S. D., Pereira Galúcio, J. M., Taube, P. S., Costa, C. M. L., ... & Faria, L. J. G. D. (2020). Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: New findings and potential applications. *Biomolecules*, 10(7), 988.
- Dusane, D. H., Hosseinidoust, Z., Asadishad, B., & Tufenkji, N. (2014). Alkaloids modulate motility, biofilm formation and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 9(11), e112093.

- Dos Santos, F. J., Lopes, J. A. D., Cito, A. G. L., De Oliveira, E. H., De Lima, S. G., & Reis, F. D. A. (2004). Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* HBK. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 504-506.
- Demirci, M., Yiğın, A., & Demir, C. (2021). Efficacy of antimicrobial peptide LL-37 against biofilm forming *Staphylococcus aureus* strains obtained from chronic wound infections. *Microbial pathogenesis*, 105368.
- Du, B., Gu, Y., Chen, G., Wang, G., & Liu, L. (2020). Flagellar motility mediates early-stage biofilm formation in oligotrophic aquatic environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 194, 110340.
- Derakhshan, S., Navidinia, M., & Haghi, F. (2021). Antibiotic susceptibility of human-associated *Staphylococcus aureus* and its relation to agr typing, virulence genes, and biofilm formation. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1-10.
- Divyakolu, S., Chikkala, R., Kamaraju, S., & Sritharan, V. (2021). Quorum quenching as a strategy for treating Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA)-Effect of ϵ -Polylysine, ethanolic extracts of guava leaves and mango seed kernel. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics (IJBB)*, 58(2), 171-177.
- de Sousa, J. P., de Azerêdo, G. A., de Araújo Torres, R., da Silva Vasconcelos, M. A., da Conceição, M. L., & de Souza, E. L. (2012). Synergies of carvacrol and 1, 8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International journal of food microbiology*, 154(3), 145-151.
- Friedman, N. D., Temkin, E., & Carmeli, Y. (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5), 416-422.
- Ferreira, C., Gonçalves, B., Vilas Boas, D., Oliveira, H., Henriques, M., Azeredo, J., & Silva, S. (2016). *Candida tropicalis* biofilm and human epithelium invasion is highly influenced by environmental pH. *Pathogens and disease*, 74(8).
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H., & O'Gara, J. P. (2005). Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*, 43(4), 1973-1976.
- Foster, T. J. (2019). The MSCRAMM family of cell-wall-anchored surface proteins of gram-positive cocci. *Trends in microbiology*, 27(11), 927-941.
- Frassinetti, S., Falleni, A., & Del Carratore, R. (2020). Effect of itraconazole on *Staphylococcus aureus* biofilm and extracellular vesicles formation. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104267.
- Fang, B., Liu, B., & Sun, B. (2020). Transcriptional regulation of virulence factors Hla and phenol-soluble modulins α by AraC-type regulator Rbf in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(5), 151436.
- Fernández-Barat, L., Ben-Aicha, S., Motos, A., Vila, J., Marco, F., Rigol, M., ... & Torres, A. (2018). Assessment of in vivo versus in vitro biofilm formation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from endotracheal tubes. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.

- Furlani, R., SOUSA, M., ROCHA, G. N. D. S. A., Vilar, F. C. R., Ramalho, R. C., & Peixoto, R. D. M. (2021). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST PATHOGENS OF IMPORTANCE IN CAPRINE AND OVINE MASTITIS. *Revista Caatinga*, 34, 702-708.
- Gómez-Sequeda, N., Ruiz, J., Ortiz, C., Urquiza, M., & Torres, R. (2020). Potent and specific antibacterial activity against *Escherichia coli* O157: H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of G17 and G19 peptides encapsulated into Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) nanoparticles. *Antibiotics*, 9(7), 384.
- Gedikoglu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food science & nutrition*, 7(5), 1704-1714.
- Gómez-Sequeda, N., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., & Ortiz, C. (2020). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oils against *Escherichia coli* O157: H7 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antibiotics*, 9(11), 730.
- Gu, Q., Sun, T., Wu, G., Li, M., & Qiu, W. (2014). Influence of carrier filling ratio on the performance of moving bed biofilm reactor in treating coking wastewater. *Bioresource technology*, 166, 72-78.
- 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. *PloS one*, 13(1), e0191705.
- Gales, A. C., Castanheira, M., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2012). Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 73(4), 354-360.
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*, 11(7), 1034-1043.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176-187.
- 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.
- Haider, S., & Pal, R. (2013). Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Current genomics*, 14(2), 91-110.
- Hernández-Gómez, C., Blanco, V. M., Motoa, G., Correa, A., Vallejo, M., & Villegas, M. V. (2014). Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*, 34, 91-100.
- Hoang, T. M., Zhou, C., Lindgren, J. K., Galac, M. R., Corey, B., Endres, J. E., ... & Fey, P. D. (2019). Transcriptional regulation of *icaADBC* by both *IcaR* and *TcaR* in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*, 201(6), e00524-18.

- Hood, J. R., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. (2003). Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research*, 15(6), 428-433.
- Inamuco, J., Veenendaal, A. K., Burt, S. A., Post, J. A., Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. (2012). Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella Typhimurium* motility and invasion of porcine epithelial cells. *Veterinary microbiology*, 157(1-2), 200-207.
- Itoh, Y., Rice, J. D., Goller, C., Pannuri, A., Taylor, J., Meisner, J., ... & Romeo, T. (2008). Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly- β -1, 6-N-acetyl-D-glucosamine. *Journal of bacteriology*, 190(10), 3670-3680.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11.
- Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., & Yao, K. (2019). Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases. *BioMed Research International*, 2019.
- Jakubowski, W., & Walkowiak, B. (2015). Resistance of oxidative stress in biofilm and planktonic cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 300-308.
- Jafri, H., Ansari, F. A., & Ahmad, I. (2019). Prospects of essential oils in controlling pathogenic biofilm. In *New look to phytomedicine* (pp. 203-236). Academic Press.
- Jamali, H., Paydar, M., Radmehr, B., Ismail, S., & Dadrasnia, A. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food Control*, 54, 383-388.
- Jani, S., Seely, A. L., Jayaraman, A., & Manson, M. D. (2017). Chemotaxis to self-generated AI-2 promotes biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 163(12), 1778-1790.
- Jacquet, R., LaBauve, A. E., Akoolo, L., Patel, S., Alqarzaee, A. A., Wong Fok Lung, T., ... & Parker, D. (2019). Dual gene expression analysis identifies factors associated with *Staphylococcus aureus* virulence in diabetic mice. *Infection and immunity*, 87(5), e00163-19.
- Jeng, W. Y., Ko, T. P., Liu, C. I., Guo, R. T., Liu, C. L., Shr, H. L., & Wang, A. H. J. (2008). Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Nucleic acids research*, 36(5), 1567-1577.
- Kaatz, G. W., Seo, S. M., & Ruble, C. A. (1993). Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(5), 1086-1094.
- Kong, K. F., Vuong, C., & Otto, M. (2006). *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International journal of medical microbiology*, 296(2-3), 133-139.
- Kalisky, T., Oriel, S., Bar-Lev, T. H., Ben-Haim, N., Trink, A., Wineberg, Y., ... & Pyne, S. (2018). A brief review of single-cell transcriptomic technologies. *Briefings in Functional Genomics*, 17(1), 64-76.

- Khaledi, A., Schniederjans, M., Pohl, S., Rainer, R., Bodenhofer, U., Xia, B., ... & Häussler, S. (2016). Transcriptome profiling of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(8), 4722-4733.
- Krist, K. A., Ross, T., & McMeekin, T. A. (1998). Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. *International journal of food microbiology*, 43(3), 195-203.
- Kalinka, J., Hachmeister, M., Geraci, J., Sordelli, D., Hansen, U., Niemann, S., ... & Tuchscher, L. (2014). *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1038-1049.
- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W43-W46.
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(18), 3042-3053.
- Kim, M. K., Zhao, A., Wang, A., Brown, Z. Z., Muir, T. W., Stone, H. A., & Bassler, B. L. (2017). Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development. *Nature microbiology*, 2(8), 1-12.
- Kim, T., Duong, T., Wu, C. A., Choi, J., Lan, N., Kang, S. W., ... & Kim, K. K. (2014). Structural insights into the molecular mechanism of *Escherichia coli* SdiA, a quorum-sensing receptor. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(3), 694-707.
- Li, Y. H., & Tian, X. L. (2016). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms: bacterial cooperation and competition. *Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria*, 1195-1205.
- Lin, J., Zhou, D., Steitz, T. A., Polikanov, Y. S., & Gagnon, M. G. (2018). Ribosome-targeting antibiotics: modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design. *Annual review of biochemistry*, 87, 451-478.
- Li, X., Jin, J., Zhang, X., Xu, F., Zhong, J., Yin, Z., ... & Shuai, J. (2021). Quantifying the optimal strategy of population control of quorum sensing network in *Escherichia coli*. *NPJ Systems Biology and Applications*, 7(1), 1-16.
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7), a000398.
- Lories, B., Roberfroid, S., Dieltjens, L., De Coster, D., Foster, K. R., & Steenackers, H. P. (2020). Biofilm bacteria use stress responses to detect and respond to competitors. *Current Biology*, 30(7), 1231-1244.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS computational biology*, 13(5), e1005457.

- Lee, J. H., Kim, Y. G., Gupta, V. K., Manoharan, R. K., & Lee, J. (2018). Suppression of fluconazole resistant *Candida albicans* biofilm formation and filamentation by methylindole derivatives. *Frontiers in microbiology*, 9, 2641.
- Lee, K., Lee, J. H., Ryu, S. Y., Cho, M. H., & Lee, J. (2014). Stilbenes reduce *Staphylococcus aureus* hemolysis, biofilm formation, and virulence. *Foodborne pathogens and disease*, 11(9), 710-717.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J. M., Joo, H. S., & Kim, J. S. (2019). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media. *Journal of clinical medicine*, 8(11), 1853.
- Leal, A. L. A. B., Braga, A. L., de Araújo Barbosa, B., Rodrigues, A. M. X., de Carvalho Teixeira, F. A. F., da Silva, K. M. R., ... & de Medeiros, M. D. G. F. (2019). Antimicrobial action of essential oil of *Lippia origanoides* HBK. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, 5(1), 007-012.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.
- Lins, L., Dal Maso, S., Foncoux, B., Kamili, A., Laurin, Y., Genva, M., ... & Deleu, M. (2019). Insights into the relationships between herbicide activities, molecular structure and membrane interaction of cinnamon and citronella essential oils components. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 4007.
- Lee, J., Maeda, T., Hong, S. H., & Wood, T. K. (2009). Reconfiguring the quorum-sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acylhomoserine lactones. *Applied and environmental microbiology*, 75(6), 1703-1716.
- Lim, Y., Jana, M., Luong, T. T., & Lee, C. Y. (2004). Control of glucose-and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 186(3), 722-729.
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., ... & Li, M. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese medicine*, 14(1), 1-17.
- Ma, R., Qiu, S., Jiang, Q., Sun, H., Xue, T., Cai, G., & Sun, B. (2017). AI-2 quorum sensing negatively regulates rbf expression and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(4-5), 257-267.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
- Mittal RP., Rana A., Jaitak V., (2019). Essential Oils: An Impending Substitute of Synthetic Antimicrobial Agents to Overcome Antimicrobial Resistance. *Laboratory of Natural Product Chemistry, Central University of Punjab* 20(6):605-624.

- Mackowiak, M., Leifels, M., Hamza, I. A., Jurzik, L., & Wingender, J. (2018). Distribution of *Escherichia coli*, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. *Science of the Total Environment*, 626, 650-659.
- Mello, P. L., Riboli, D. F. M., Martins, L. D. A., Brito, M. A. V. P., Victória, C., Calixto Romero, L., ... & de Lourdes, M. (2020). *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis in different regions of Brazil: Molecular typing and biofilm gene expression analysis by RT-qPCR. *Antibiotics*, 9(12), 888.
- Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., & Fauci, A. S. (2016). Antimicrobial resistance. *Jama*, 316(11), 1193-1204.
- Marangoni, P. R., Rob, D., Dalzoto, P. R., & Marcos, A. C. (2013). Microbial diversity of biofilms on metallic surfaces in natural waters. *Journal of Water Resource and Hydraulic Engineering*, 2, 140-148.
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 371-382.
- Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2018). Host Response to *Staphylococcus aureus* Quorum Sensing Is NO. *Cell host & microbe*, 23(5), 578-580.
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.
- Miyae, S., Suzuki, E., Komiyama, Y., Kondo, Y., Morikawa, M., & Maeda, S. (2018). Bacterial memory of persisters: bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony-biofilm culture. *Frontiers in microbiology*, 9, 1396.
- Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., & Man, L. (2019). Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens*, 8(1), 15.
- Maldonado, N. A., Múnera, M. I., López, J. A., Sierra, P., Robledo, C., Robledo, J., & GERMEN, G. (2014). Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012: resultados de seis años de vigilancia. *Biomédica*, 34(3), 433-446.
- McCarthy, H., Rudkin, J. K., Black, N. S., Gallagher, L., O'Neill, E., & O'Gara, J. P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 1.
- MacWilliams, M. P., & Liao, M. K. (2006). Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. ASM MicrobeLibrary. American Society for Microbiology.
- Manner, S., Goeres, D. M., Skogman, M., Vuorela, P., & Fallarero, A. (2017). Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by antibiotics in 96-Microtiter Well Plates and Drip Flow Reactors: Critical factors influencing outcomes. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- 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.

- Marinelli, L., Di Stefano, A., & Cacciatore, I. (2018). Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. *Phytochemistry Reviews*, 17(4), 903-921.
- Medeiros Barreto, H., Cerqueira Fontinele, F., Pereira de Oliveira, A., Arcanjo, D. D. R., Cavalcanti dos Santos, B. H., de Abreu, A. P. L., ... & Dantas Lopes, J. A. (2014). Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia origanoides* HBK in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed research international*, 2014.
- Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2018). Host Response to *Staphylococcus aureus* Quorum Sensing Is NO. *Cell host & microbe*, 23(5), 578-580.
- 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.
- Montgomery, C. P., Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2010). Importance of the global regulators Agr and SaeRS in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. *PloS one*, 5(12), e15177.
- Morales, L., Echeverz, M., Trobos, M., Solano, C., & Lasa, I. (2020). Diversity in regulatory regions of *icaADBCR* and *fnbAB* genes among *Staphylococcus aureus* strains isolated from periprosthetic joint infections (No. biofilms9-71). *Copernicus Meetings*.
- Mohammed Jaddoa, N. T., & Al-Mathkhury, H. J. F. (2018). Biofilm Shows Independency form Hemolysin Genes Arsenal in Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Iraqi Journal of Science*, 2184-2194.
- Mahmoudi, H., Pourhajibagher, M., Alikhani, M. Y., & Bahador, A. (2019). The effect of antimicrobial photodynamic therapy on the expression of biofilm associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from wound infections in burn patients. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 25, 406-413.
- Nisar, P., Ali, N., Rahman, L., Ali, M., & Shinwari, Z. K. (2019). Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24(7), 929-941.
- Nuti, R., Goud, N. S., Saraswati, A. P., Alvala, R., & Alvala, M. (2017). Antimicrobial peptides: a promising therapeutic strategy in tackling antimicrobial resistance. *Current medicinal chemistry*, 24(38), 4303-4314.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., & Foster, K. R. (2008). The sociobiology of biofilms. *FEMS microbiology reviews*, 33(1), 206-224.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., ... & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
- NIA, A. F., BADI, H. N., MEHRAFARIN, A., BAHMAN, S., & SAHANDI, M. S. (2016). Changes in the essential oil content and terpene composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by using plant biostimulants. *Acta agriculturae Slovenica*, 107(1), 147-157.

- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. D. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, 31, 247-256.
- Oliveira, N. M., Martinez-Garcia, E., Xavier, J., Durham, W. M., Kolter, R., Kim, W., & Foster, K. R. (2015). Biofilm formation as a response to ecological competition. *PLoS biology*, 13(7), e1002191.
- 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*, 4(1), 1-9.
- Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., & Yang, C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 4(2), 126-136.
- Ortiz Mateus, A. D., Lozano Marchena, G. L., & López Cáceres, G. K. (2020). Prevalencia de genes de resistencia a la colistina en patotipos y comensales de *Escherichia Coli* aislados de menores de 5 años en el área metropolitana de Bucaramanga.
- Orozco, R. C., Ferrer, L. V., Jiménez, J. R., & Guzmán, N. A. (2018). Resistencia antimicrobiana en *staphylococcus aureus* y *staphylococcus epidermidis*: tendencia temporal (2010-2016) y fenotipos de multirresistencia, Cartagena (Colombia). *Biosalud*, 17(2), 25-36.
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(5), 877-886.
- Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., & Yang, C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 4(2), 126-136.
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (47).
- Oliveira, D. R., Leitao, G. G., Bizzo, H. R., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* HBK. *Food Chemistry*, 101(1), 236-240.
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Fernandes, P. D., & Leitão, S. G. (2014). Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 206-214.
- Oroh, S. B., Mustopa, A. Z., Budiarti, S., & Budiarto, B. R. (2020). Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* biofilm formation by DNA aptamer. *Molecular Biology Reports*, 47(10), 7567-7573.
- Oliveira, M. C., Maia, J. P. C., Krepsky, P. B., Lucchese, A. M., Stipp, R. N., Joia, F., ... & Gusmão, I. C. C. P. Influence of *Lippia thymoides* Mart. & *Schauer* and *Lippia organoides* Kunth essential oils on planktonic cell and *Streptococcus mutans* biofilm growth.
- 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.

- Ozkan, A., & Erdogan, A. (2012). A comparative study of the antioxidant/prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells. *Natural product communications*, 7(12), 1934578X1200701201.
- Ogasawara, H., Ishizuka, T., Hotta, S., Aoki, M., Shimada, T., & Ishihama, A. (2020). Novel regulators of the *csgD* gene encoding the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, 166(9), 880-890.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos. 2016;1–30.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos. 2018; 1-35
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos. 2019.
- Patel, R. (2005). Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 437, 41-47.
- Paramanantham, P., Pattnaik, S., & Busi, S. (2018). Quorum sensing in bacterial pathogenesis and virulence. In *Implication of quorum sensing system in biofilm formation and virulence* (pp. 111-132). Springer, Singapore.
- Penesyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, 20(4), 5286-5298.
- Pray, L. (2008). Antibiotic resistance, mutation rates and MRSA. *Nature Education*, 1(1), 30.
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576-588.
- Peng, M., Tabashsum, Z., Patel, P., Bernhardt, C., & Biswas, D. (2018). Linoleic acids overproducing *Lactobacillus casei* limits growth, survival, and virulence of *Salmonella Typhimurium* and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2663.
- Pava, C. N. R., Sanabria, A. G. Z., & Leal, L. C. S. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Nova*, 15(27), 119-129.
- Paramanantham, P., Antony, A. P., Lal, S. S., Sharan, A., Syed, A., Ahmed, M., ... & Kaviyarasu, K. (2018). Antimicrobial photodynamic inactivation of fungal biofilm using amino functionalized mesoporous silica-rose bengal nanoconjugate against *Candida albicans*. *Scientific African*, 1, e00007.
- Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K. S., Gomes, M. D. M., Lima, F. C., Lahlou, S., Magalhães, P. J. C., ... & Leal-Cardoso, J. H. (2010). Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & clinical pharmacology*, 24(3), 341-350.
- Parkinson, J. S., Hazelbauer, G. L., & Falke, J. J. (2015). Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends in microbiology*, 23(5), 257-266.

- Poli, J. P., Guinoiseau, E., de Rocca Serra, D., Sutour, S., Paoli, M., Tomi, F., ... & 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), 2125.
- Prüß, B. M., Besemann, C., Denton, A., & Wolfe, A. J. (2006). A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 188(11), 3731-3739.
- 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*, 4(1), 1-9.
- Rossi, R., Yang, W., Zikmund, E., Pant, D., & Logan, B. E. (2018). In situ biofilm removal from air cathodes in microbial fuel cells treating domestic wastewater. *Bioresource technology*, 265, 200-206.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482.
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250-264.
- Rossi, E., Cimmins, A., Lühje, P., Brauner, A., Sjöling, Å., Landini, P., & Römling, U. (2018). “It’s a gut feeling”—*Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Critical reviews in microbiology*, 44(1), 1-30.
- Rendueles, O., de Sousa, J. A. M., Bernheim, A., Touchon, M., & Rocha, E. P. (2018). Genetic exchanges are more frequent in bacteria encoding capsules. *PLoS genetics*, 14(12), e1007862.
- Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. *Annual review of food science and technology*, 10, 365-387.
- Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. *Annual review of food science and technology*, 10, 365-387.
- Ramanathan, M., Porter, D. F., & Khavari, P. A. (2019). Methods to study RNA–protein interactions. *Nature methods*, 16(3), 225-234.
- Rocha, C., Reynolds, N. D., & Simons, M. P. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32, 139-145.
- Ravichandar, J. D., Bower, A. G., Julius, A. A., & Collins, C. H. (2017). Transcriptional control of motility enables directional movement of *Escherichia coli* in a signal gradient. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Sharma, C., Rokana, N., Chandra, M., Singh, B. P., Gulhane, R. D., Gill, J. P. S., ... & Panwar, H. (2018). Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. *Frontiers in veterinary science*, 4, 237.

- Snieszko, S. F. (1958). Natural resistance and susceptibility to infections. *The Progressive Fish-Culturist*, 20(3), 133-136.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Girón, J. A., & Kaper, J. B. (2001). Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of bacteriology*, 183(17), 5187-5197.
- Sperandio, V., Torres, A. G., & Kaper, J. B. (2002). Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Molecular microbiology*, 43(3), 809-821.
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The open microbiology journal*, 11, 53.
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., & Bisht, R. (2019). Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. *Indian journal of microbiology*, 59(1), 3-12.
- Soares, A., Roussel, V., Pestel-Caron, M., Barreau, M., Caron, F., Bouffartigues, E., ... & Etienne, M. (2019). Understanding ciprofloxacin failure in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: persister cells survive matrix disruption. *Frontiers in microbiology*, 10, 2603.
- Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H. G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(5), 625-644.
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, S. M., & Mirmoghtadaie, L. (2017). Antimicrobial activity of essential oil. *Essential Oils in Food Processing*; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 191-229.
- Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 343, 128403.
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International journal of medical microbiology*, 292(2), 107-113.
- Sagar, S. S., Kumar, R., & Kaistha, S. D. (2016). Biofilm-an eternal chronicle of bacteria. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, 37(2), 45-56.
- Simmons, E. L., Bond, M. C., Koskella, B., Drescher, K., Bucci, V., & Nadell, C. D. (2020). Biofilm structure promotes coexistence of phage-resistant and phage-susceptible bacteria. *Msystems*, 5(3), e00877-19.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93-103.
- Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3), e00026-19.
- Singh, A., Gupta, R., Tandon, S., & Pandey, R. (2018). Anti-biofilm and anti-virulence potential of 3, 7-dimethyloct-6-enal derived from *Citrus hystrix* against bacterial blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Microbial pathogenesis*, 115, 264-271.

- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & d'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8746-8749.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47.
- Sarrazin, S. L. F., da Silva, L. A., Oliveira, R. B., Raposo, J. D. A., da Silva, J. K. R., Salimena, F. R. G., ... & 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.
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5), 269-279.
- Santana, H. T., Trindade, F. T. T., RG, S., Silva, A. A. E., Militão, J. S. T. L., & Facundo, V. A. (2015). Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 17, 105-111.
- Song, S., & Wood, T. K. (2021). The Primary Physiological Roles of Autoinducer 2 in *Escherichia coli* Is Chemotaxis and Biofilm Formation. *Microorganisms*, 9(2), 386.
- Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3), e00026-19.
- Shrestha, R., Khanal, S., Poudel, P., Khadayat, K., Ghaju, S., Bhandari, A., ... & Marasini, B. P. (2019). Extended spectrum β -lactamase producing uropathogenic *Escherichia coli* and the correlation of biofilm with antibiotics resistance in Nepal. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 18(1), 1-6.
- Sharma, V. K., Johnson, N., Cizmas, L., McDonald, T. J., & Kim, H. (2016). A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*, 150, 702-714.
- Schrader, S. M., Vaubourgeix, J., & Nathan, C. (2020). Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it. *Science translational medicine*, 12(549).
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., ... & Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., ... & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial pathogenesis*, 134, 103580.
- Tian, S., Krueger, J. G., Li, K., Jabbari, A., Brodmerkel, C., Lowes, M. A., & Suárez-Fariñas, M. (2012). Meta-analysis derived (MAD) transcriptome of psoriasis defines the "core" pathogenesis of disease.
- Theophel, K., Schacht, V. J., Schlüter, M., Schnell, S., Stingu, C. S., Schaumann, R., & Bunge, M. (2014). The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles. *Frontiers in microbiology*, 5, 544.

- Tessler, M., Dascal, A., Gioseffini, S., Miller, M., & Mendelson, J. (1992). Growth curves of *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, and *Moraxella osloensis* in propofol and other media. *Canadian journal of anaesthesia*, 39(5), 509.
- Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M., & Li, S. (2018). Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (agr) system. *Frontiers in microbiology*, 9, 55.
- Truchado, P., Larrosa, M., Castro-Ibáñez, I., & Allende, A. (2015). Plant food extracts and phytochemicals: their role as quorum sensing inhibitors. *Trends in Food Science & Technology*, 43(2), 189-204.
- Tuttobene, M. R., Pérez, J. F., Pavesi, E. S., Perez Mora, B., Biancotti, D., Cribb, P., ... & Mussi, M. A. (2020). Light modulates important pathogenic determinants and virulence in ESKAPE pathogens *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 203(5), e00566-20.
- Utari, P. D., Vogel, J., & Quax, W. J. (2017). Deciphering physiological functions of AHL quorum quenching acylases. *Frontiers in microbiology*, 8, 1123.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. J. A. E. M. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-1568.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- Vadakkan, K., Choudhury, A. A., Gunasekaran, R., Hemapriya, J., & Vijayanand, S. (2018). Quorum sensing intervened bacterial signaling: Pursuit of its cognizance and repression. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 239-252.
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2), 59.
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Frontiers in chemistry*, 7, 824.
- Van Wolferen, M., Orell, A., & Albers, S. V. (2018). Archaeal biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(11), 699-713.
- Vollmer, T., Dabisch-Ruthe, M., Weinstock, M., Knabbe, C., & Dreier, J. (2018). Late sampling for automated culture to extend the platelet shelf life to 5 days in Germany. *Transfusion*, 58(7), 1654-1664.
- Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., & Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 11(11), 2786.
- Valle, J., Echeverz, M., & Lasa, I. (2019). σB inhibits poly-N-acetylglucosamine exopolysaccharide synthesis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 201(11), e00098-19.

- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J. M., Amorena, B., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2003). SarA and not σ B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 48(4), 1075-1087.
- Vuong, C., Saenz, H. L., Götz, F., & Otto, M. (2000). Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious diseases*, 182(6), 1688-1693.
- Wang, B., Duan, J., Jin, Y., Zhan, Q., Xu, Y., Zhao, H., ... & Yu, F. (2021). Functional Insights of MraZ on the Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *Infection and drug resistance*, 14, 4539.
- Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P., & Sprenger, M. (1998). Antimicrobial resistance.
- Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551(7680), 313-320.
- Wood, T. K. (2017). Strategies for combating persister cell and biofilm infections. *Microbial biotechnology*, 10(5), 1054-1056.
- Wu, H. J., Wang, A. H., & Jennings, M. P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current opinion in chemical biology*, 12(1), 93-101.
- Wijesinghe, G., Dilhari, A., Gayani, B., Kottegoda, N., Samaranyake, L., & Weerasekera, M. (2019). Influence of laboratory culture media on in vitro growth, adhesion, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Medical Principles and Practice*, 28(1), 28-35.
- Wood, T. K., Barrios, A. F. G., Herzberg, M., & Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 361-367.
- Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551(7680), 313-320.
- Xue, G., & Yujian, R. (2020). Larvicidal and ovicidal activity of carvacrol, p-cymene, and γ -terpinene from *Origanum vulgare* essential oil against the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Environmental science and pollution research international*, 27(15), 18708-18716.
- Yao, Y., Martinez-Yamout, M. A., Dickerson, T. J., Brogan, A. P., Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2006). Structure of the *Escherichia coli* quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. *Journal of molecular biology*, 355(2), 262-273.
- Yagi, S., Babiker, R., Tzanova, T., & Schohn, H. (2016). Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(8), 763-770.
- Yuan, W., & Yuk, H. G. (2019). Effects of sublethal thymol, carvacrol, and trans-cinnamaldehyde adaptation on virulence properties of *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and environmental microbiology*, 85(14), e00271-19.

- Yang, X., Sha, K., Xu, G., Tian, H., Wang, X., Chen, S., ... & Huang, N. (2016). Subinhibitory concentrations of allicin decrease uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) biofilm formation, adhesion ability, and swimming motility. *International journal of molecular sciences*, 17(7), 979.
- Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M., & Greenberg, E. P. (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of bacteriology*, 186(6), 1838-1850.
- Yoshida, M., Thiriet-Rupert, S., Mayer, L., Beloin, C., & Ghigo, J. M. (2021). Selection for non-specific adhesion is a driver of FimH evolution increasing *Escherichia coli* biofilm capacity. *bioRxiv*.
- Yang, K., Meng, J., Huang, Y. C., Ye, L. H., Li, G. J., Huang, J., & Chen, H. M. (2014). The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in epinephrine-enhanced motility and biofilm formation by *Escherichia coli*. *Cell biochemistry and biophysics*, 70(1), 391-398.
- Yeo, W. S., Anokwute, C., Marcadis, P., Levitan, M., Ahmed, M., Bae, Y., ... & Bae, T. (2020). A membrane-bound transcription factor is proteolytically regulated by the AAA+ protease FtsH in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 202(9), e00019-20.
- Zhao, X., Yu, Z., & Ding, T. (2020). Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms*, 8(3), 425.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keefe, S., ... & Wu, J. Q. (2020). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929-11947.
- Zhang, D., Gan, R. Y., Zhang, J. R., Farha, A. K., Li, H. B., Zhu, F., ... & Corke, H. (2020). Antivirulence properties and related mechanisms of spice essential oils: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(3), 1018-1055.
- Zuberi, A., Ahmad, N., & Khan, A. U. (2017). CRISPRi induced suppression of fimbriae gene (*fimH*) of a uropathogenic *Escherichia coli*: an approach to inhibit microbial biofilms. *Frontiers in immunology*, 8, 1552.

11. ANEXOS

Tabla 1 Anexos. Concentración Mínima Bactericida (CMB) en mg/mL determinada en el *screening* inicial para los aceites evaluados. Los experimentos se realizaron por triplicado, se realizó ANOVA ($p < 0.05$).

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
Aceite Esencial	MCB (mg/mL)	MCB (mg/mL)
<i>Lippia alba citral</i>	> 1.5	> 1.5
<i>Cymbopogon martini</i>	> 1.5	> 1.5
<i>Lippia origanoides LTC II</i>	0.75	0.75
<i>Lippia origanoides LTC I</i>	1	1
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1.5	1.5
<i>Lippia alba carvona</i>	> 1.5	> 1.5
<i>Cymbopogon nordus</i>	> 1.5	> 1.5
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	> 1.5	> 1.5
<i>Lippia origanoides felandreno</i>	1.5	> 1.5
<i>Salvia officinalis</i>	> 1.5	> 1.5
<i>Swinglea glutinosa</i>	> 1.5	1.5
<i>Tagetes lucida</i>	> 1.5	> 1.5
<i>Thymus vulgaris</i>	1	1
<i>Satureja viminea</i>	> 1.5	> 1.5
<i>Cananga odorata</i>	> 1.5	> 1.5
Extracto vegetal 1	> 1.5	> 1.5
Extracto vegetal 2	> 1.5	> 1.5
Extracto vegetal 3	> 1.5	> 1.5
Extracto vegetal 4	> 1.5	> 1.5
Extracto vegetal 5	> 1.5	> 1.5

Tabla 2 Anexos. Formación de biopelículas en *E. coli* y *S. aureus*

Medios	<i>E. coli</i>				<i>S. aureus</i>			
	24 horas		48 horas		24 horas		48 horas	
	DO	UFC/mL	OD	UFC/mL	OD	UFC/mL	OD	UFC/mL
BHI	0,326	5,7 x 10 ³	0,272	5 x 10 ³	0,423	5,3 x 10 ⁴	0,366	4 x 10 ⁴
MH	0,225	2,3 x 10 ³	0,206	1,5 x 10 ³	0,403	2 x 10 ⁴	0,443	1,7 x 10 ⁴
TSB	-	-	-	-	0,571	2,7 x 10 ⁶	0,562	1,9 x 10 ⁶
M63	0,291	2,6 x 10 ⁴	0,283	3 x 10 ⁴	-	-	-	-
LB	0,526	4,7 x 10 ⁶	0,521	3,8 x 10 ⁶	-	-	-	-
LBc 1%	0,434	3,4 x 10 ⁶	0,392	4 x 10 ⁶	-	-	-	-
TSBg 2%	-	-	-	-	0,896	5,4 x 10 ⁷	0,706	4,3 x 10 ⁷
TSB NaCl	-	-	-	-	0,512		0,656	

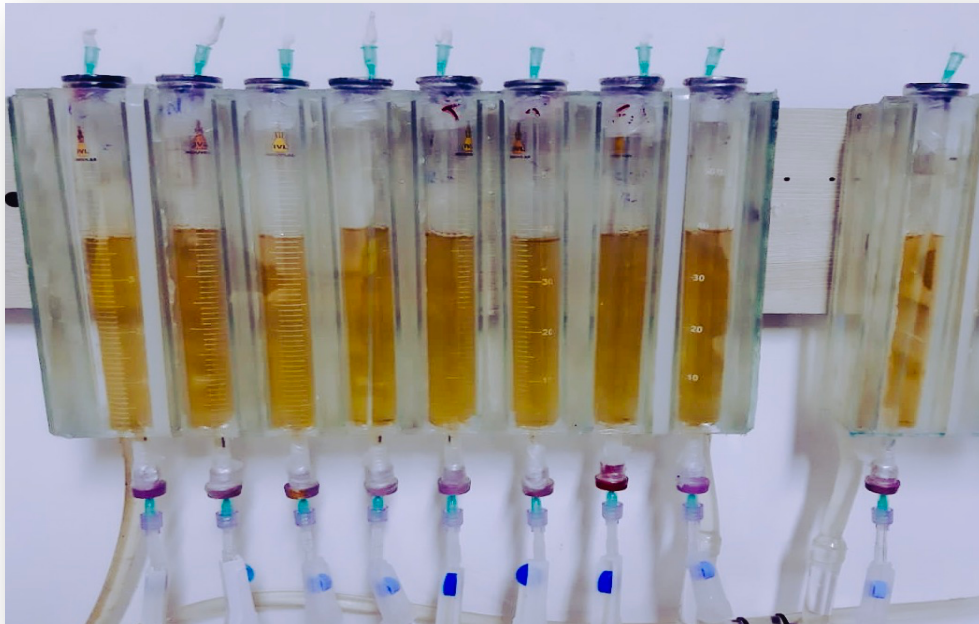


Foto 1 Anexos. Sistema de biorreactores para la obtención de biomasa de biopelículas de *E. coli* y *S. aureus*. Cuenta con un sistema de control de temperatura, oxigenación e intercambio de gases.

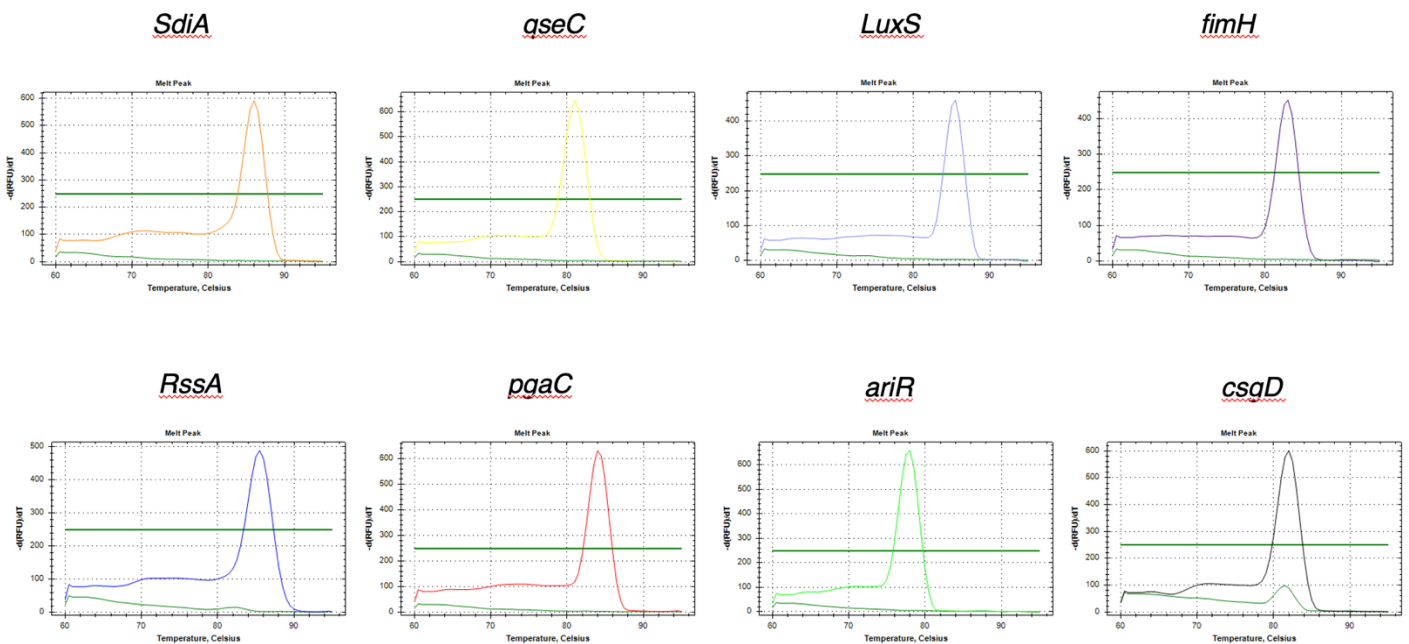


Figura 1 Anexos. Curvas de temperatura *melting* de los genes evaluados en *E. coli* ATCC 25922, con su respectivo control negativo. Se observa un único pico de amplificación.

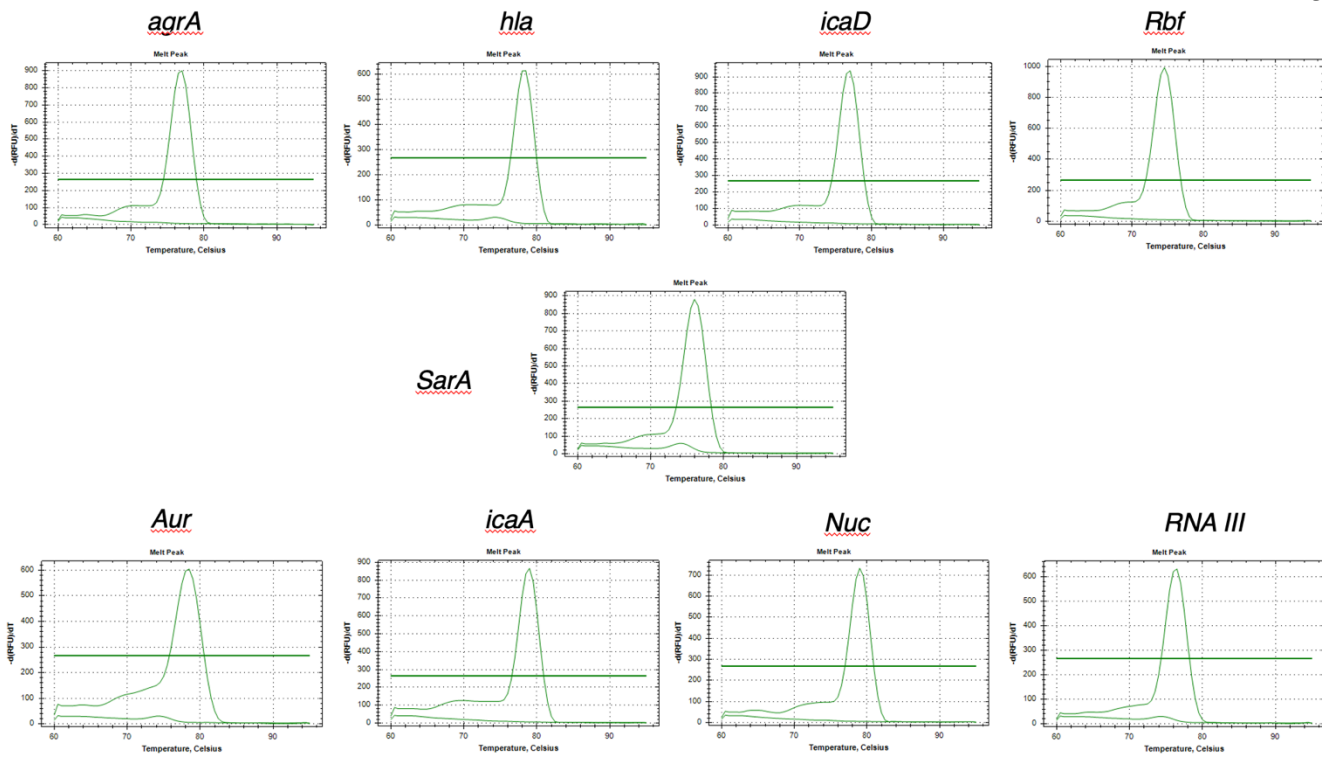


Figura 1 Anexos. Curvas de temperatura *melting* de los genes evaluados en *S. aureus* ATCC 29213, con su respectivo control negativo. Se observa un único pico de amplificación.