

Efecto del aceite esencial de *Lippia graveolens* Kunth (orégano mexicano) sobre la biopelícula de *Salmonella* Typhimurium

Effect of the essential oil of *Lippia graveolens* Kunth (mexican oregano) on *Salmonella* Typhimurium biofilm

Annie Rubio Ortega^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-8780-3081>

Beatriz Álvarez Pita¹ <https://orcid.org/0000-0002-7093-9908>

María del Carmen Travieso Novelles¹ <https://orcid.org/0000-0002-5672-349X>

Ailin Martínez Vasallo² <https://orcid.org/0000-0003-0716-9290>

Oriela Pino Pérez¹ <https://orcid.org/0000-0002-9754-8966>

Ivette Espinosa Castaño³ <https://orcid.org/0000-0002-8932-7047>

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Laboratorio de Ecología Química. Mayabeque, Cuba.

²Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Laboratorio de Ensayos para el Control de Calidad e Inocuidad de Alimentos (CENLAC). Mayabeque, Cuba.

³Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Laboratorio de Bacteriología. Mayabeque, Cuba.

* Autor para la correspondencia: annie@censa.edu.cu

RESUMEN

Introducción: Las plantas de *Lippia graveolens* Kunth (sin: *L. berlandieri* Schauer) se han utilizado con fines terapéuticos para afecciones respiratorias y digestivas. El aceite esencial de plantas cultivadas en Cuba tiene una poderosa actividad antibacteriana sobre *Salmonella enterica*.

Objetivo: Evaluar la actividad del aceite esencial de plantas de *Lippia graveolens* Kunth cultivadas en Cuba sobre biopelículas de *Salmonella* Typhimurium.

Métodos: El efecto inhibitor de este aceite esencial sobre la formación de biopelículas por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium cepa ATCC 14028 se determinó mediante la reducción de biomasa con violeta cristal y la concentración mínima inhibitora de biopelícula se identificó mediante recuentos en placa. Se utilizaron ensayos de *swimming* y *swarming* para evaluar el efecto sobre las estructuras de motilidad. Además, se determinaron los efectos sobre las biopelículas preformadas y la concentración mínima de erradicación de biopelículas.

Resultados: El aceite esencial de *L. graveolens* inhibe la formación de biopelículas de *S. Typhimurium* y destruye las biopelículas preformadas sin generar células persistentes. Los valores de la concentración mínima inhibitora de biopelícula del aceite esencial de *L. graveolens* coincidieron con los de la concentración mínima de erradicación de biopelículas a 0,5 mg/mL. Las concentraciones inferiores a la concentración mínima inhibitora de biopelícula del aceite de *L. graveolens* no afectan los movimientos de *swimming* y *swarming*.

Conclusiones: El estudio reveló el efecto inhibitor del aceite esencial de *L. graveolens* sobre el biofilm de *S. Typhimurium* y muestra un candidato prometedor natural para la desinfección de este patógeno.

Palabras clave: *Lippia graveolens*; aceite esencial; biopelícula; *Salmonella*.

ABSTRACT

Introduction: The plants of *Lippia graveolens* Kunth (sin: *L. berlandieri* Schauer) have been used for therapeutic of respiratory and digestive conditions. The essential oil of plants grown in Cuba has a powerful antibacterial activity on *Salmonella enterica*.

Objective: The aim of study was evaluating the activity of the essential oil of *Lippia graveolens* Kunth plants grown in Cuba on *Salmonella Typhimurium* biofilm.

Methods: The inhibition effect of this essential oil on biofilm formation by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain ATCC 14028 was determined by biomass reduction with crystal violet, and the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) was identified by plate counts. Swimming and swarming assays were used to evaluate the effect on motility structures. Also, the effects on preformed biofilms and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) were determined.

Results: The essential oil of *L. graveolens* inhibits the formation of biofilms of *S. Typhimurium* and destroys preformed biofilms without generating persistent cells. MBIC values of the essential oil of *L. graveolens* coincided with those of MBEC at 0,5 mg/mL. Concentrations lower than MBIC, *L. graveolens* essences does not affect the bacterial swimming and swarming movements.

Conclusions: The study revealed the inhibitory effect of *L. graveolens* essential oil on *S. Typhimurium* biofilm, and it show a natural promising candidate for disinfection of this pathogen.

Keywords: *Lippia graveolens*; essential oil; biofilm; *Salmonella*.

Recibido: 04/01/2022

Aceptado: 07/06/2022

Introducción

Desde el siglo XVIII las plantas de *Lippia graveolens* Kunth (sin: *L. berlandieri* Schauer) se utilizan con fines terapéuticos (afecciones respiratorias y digestivas).⁽¹⁾ Esta planta, originaria de Centroamérica, pertenece a la familia de las Verbenáceas y es conocida comúnmente como orégano mexicano.⁽²⁾ El aceite esencial de *L. graveolens* de plantas cultivadas en Cuba tiene una poderosa actividad antibacteriana sobre cepas de *S. enterica*, incluso sobre cepas resistentes a antibiótico.⁽³⁾ Sin embargo, se desconoce la acción sobre biopelículas.

Las bacterias pueden vivir en forma planctónica (individuales) o formando comunidades de células sésiles que crecen como biopelículas. Esta última, es la forma de vida bacteriana que con mayor frecuencia se encuentran en la naturaleza.⁽⁴⁾ Las biopelículas se pueden describir como una comunidad estructurada de células bacterianas encerradas en una matriz polimérica, adheridas a una superficie abiótica o biótica y puede estar conformada por una o varias especies bacterianas.⁽⁵⁾ A pesar de la compleja arquitectura de las biopelículas, los aceites esenciales pueden actuar en las diferentes etapas del proceso de formación y/o destruir biopelículas preformadas.⁽⁶⁾ La habilidad de los microorganismos para formar biopelículas se asocia con la virulencia y la capacidad para colonizar y sobrevivir en condiciones hostiles.⁽⁵⁾

Salmonella enterica se encuentra entre los agentes zoonóticos capaces de adherirse a las superficies, desarrollar biopelículas en ambientes bióticos (intestino animal) y abióticos (acero inoxidable).⁽⁷⁾ Además, esta barrera protectora contribuye a la resistencia a antibióticos y desinfectantes.⁽⁸⁾ A diferencia de las bacterias planctónicas, las biopelículas brindan una ventaja de supervivencia a la comunidad microbiana, mostrando un aumento de aproximadamente 1 000 veces la resistencia a los antimicrobianos.⁽⁹⁾ Por tales razones se hace necesario evaluar el efecto de productos utilizados como antimicrobianos sobre las biopelículas bacterianas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del aceite esencial de *L. graveolens* de plantas cultivadas en Cuba sobre biopelículas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium.

Métodos

Obtención del aceite esencial

El aceite esencial de *L. graveolens* fue suministrado por el Laboratorio de Ecología Química del CENSA. El material vegetal se recolectó en el Instituto de Investigaciones Hortícolas “Lilliana Dimitrova”, ubicado en Quivicán, Mayabeque, Cuba (22.8730737,-82.3810180). El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación durante tres horas utilizando un equipo Clevenger.⁽¹⁰⁾ Este aceite fue previamente caracterizado y su composición química analizada por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS). Sus compuestos mayoritarios fueron timol (42,7 %), carvacrol (22,2 %) y p-cimeno (6,5 %).

Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano

Se utilizó la cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 conservada en el Laboratorio de Ensayos para la Inocuidad y Control de Calidad de los Alimentos (CENLAC) del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Antes de cada experimento, la cepa se cultivó de forma rutinaria en agar triptonsoya (ATS, BioCen) a 36 °C.

Inhibición de la formación de biopelícula

La capacidad del aceite esencial de *L. graveolens* para inhibir el proceso de formación de biopelículas de *S. Typhimurium* se determinó siguiendo el protocolo modificado por Čabarkapa y

otros en 2019.⁽¹¹⁾ Se preparó el aceite esencial de *L. graveolens* en un gradiente de concentración (0,05-2,0 mg/mL) en caldo triptona soya (CTS, BioCen) con Tween 80 (Merck, Alemania) al 0,1%. Se añadieron 100 µL en placas de 96 pocillos de cada concentración por triplicado. Se preparó una suspensión bacteriana de 10⁸ UFC/mL (0,5 McFarland) en solución salina estéril (SS) a partir de un cultivo en ATS, incubado durante 24 h (incubadora Binder, BD 23) a 36 °C. Se añadió 1 mL de la suspensión bacteriana en 9 mL CTS-T (0,1 %). Se agitó el medio inoculado y se aplicaron 100 µL en los pocillos con el aceite esencial para una concentración final 10⁶ UFC/mL de *S. Typhimurium*. Posteriormente la placa se incubó (incubadora Binder) durante 24 h a 36 °C sin agitación.

Después de la incubación se retiró el medio de cultivo, se lavó con SS y se secó a 45 °C durante 20 min. Luego, se añadió 1 mL de cristal violeta (CV) al 0,5 % (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 20 min. Se eliminó el exceso de tinción y se lavó tres veces con SS y el CV de las células de la biopelícula se resuspendió en etanol al 95 % (Merck, Alemania). La absorbancia a 530 nm se midió utilizando el lector de microplacas automatizado (espectrofotómetro SUMA, PR-621). Para cada muestra esta prueba se realizó por triplicado y se repitió tres veces.

Como control negativo se utilizó el medio CTS-T (0,1 %) y solución de hipoclorito de sodio (NaClO, ELQUIM, Cuba) a 1,0 mg/mL (concentración para la solución desinfectante para limpieza de superficies) y a 0,004 mg/mL (concentración para agua potable) se utilizaron como controles negativos.⁽¹²⁾ La concentración mínima inhibidora de la formación de biopelícula (CMIB) se determinó por crecimiento en placas de ATS.⁽⁹⁾ Luego de 24 h de incubación con los tratamientos en CTS-T (0,1 %), se retiraron las células planctónicas y se lavaron los pocillos con SS. Posteriormente, la biopelícula se resuspendió en 200 µL de SS con pipeteo vigoroso y se sembraron 100 µL en ATS por duplicado. Las placas se incubaron durante 24 h a 36 °C (incubadora Binder, BD 23). Se determinó CMIB como la concentración más baja a la que no se observa la formación de colonias bacterianas.

Dstrucción de la biopelícula preformada

Para evaluar la acción de aceite esencial de *L. graveolens* en la destrucción de las biopelículas de *S. Typhimurium* se siguió la metodología propuesta por *García-Heredia* y otros,⁽¹³⁾ con algunas modificaciones. En placas de 96 pocillos se aplicaron 200 µL de suspensión bacteriana de *S.*

S. Typhimurium a 10^6 UFC/mL en medio CTS. Fue preparada a partir de una suspensión bacteriana de 10^8 UFC/mL (0,5 McFarland) en SS de un cultivo en medio ATS de 24 h de incubación a 36°C . Las placas se incubaron (incubadora Binder, BD 23) por 24 h a 36°C sin agitación.

Después de la incubación, se determinó la densidad óptica a 620 nm usando el lector de microplaca automatizado (SUMA, PR-621). Se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con SS. Luego, se aplicó el aceite esencial de *L. graveolens* en un rango de concentraciones de 0,5-10,0 mg/mL en 200 μL de CTS-T (0,1 %). Se utilizó como control negativo medio CTS-T (0,1 %) y como control positivo CTS-DMSO al 0,1 % y suspensión de células de *S. Typhimurium*. Como variantes del experimento se empleó la solución de hipoclorito de sodio (NaClO, ELQUIM, Cuba) a las concentraciones de 5 mg/mL (para desinfección de superficies sucias) y 1 mg/mL (para desinfección de superficies limpias).⁽¹⁴⁾ Las placas se incubaron (incubadora Binder, BD 23) por 24 h a 36°C , sin agitación.

Posteriormente, se extrajo el medio, se lavó con SS y se secaron a 45°C por 20 min en posición invertida. En los pocillos se aplicó 200 μL de tinción CV por 20 min. Se retiró el exceso de tinción y se lavó tres veces con SS. Se secó durante 1 h a temperatura ambiente y se resuspendió el CV embebido en las células de la biopelícula en etanol al 95 % (Merck, Alemania). Se realizó la lectura de la absorbancia a 530 nm usando el lector de microplaca automatizado (SUMA, PR-621). Este ensayo se realizó por duplicado con tres repeticiones.

Se evaluó el efecto de destrucción de la biopelícula preformada de *S. Typhimurium* a las concentraciones de 5 y 10 mg/mL a tiempo de 2 y 3 h de tratamiento. Los datos se representaron en términos de índice de formación de biopelículas (IFB).

$$\text{IFB} = (X - M) / P$$

X: absorbancia de las células sésiles obtenidas de tinción con cristal violeta; M: absorbancia del control del medio de cultivo sin bacteria y P: absorbancia de la suspensión bacteriana en el cultivo.

Los valores de IFB mayores de 1,10 se corresponden con una formación de biopelículas fuerte; de 0,70 a 1,09 como moderado; de 0,35 a 0,69 débil y menores de 0,35 se reconoce como ausencia de biopelículas.⁽¹³⁾

Para determinar la concentración mínima erradicadora de biopelículas (CMEB) se siguió lo descrito por Cruz y otros en 2018.⁽⁹⁾ Después de 24 h de aplicados los tratamientos sobre una

biopelícula preformada de *S. Typhimurium* se extrajeron las células planctónicas y se lavaron las biopelículas con SS. Luego se resuspendió la biopelícula en 200 μ L de SS con agitación vigorosa con pipeta y 100 μ L se sembraron en dos placas de medio ATS. Las placas se incubaron por 24 h a 36 °C (incubadora Binder, BD 23). Se determinó la CMEB como la concentración mínima requerida para reducir por completo el número de células de la biopelícula.

Inhibición de movimientos *swimming* y *swarming*

Para determinar afectaciones en la motilidad de *S. Typhimurium* por la acción del aceite esencial de *L. graveolens* se desarrolló la metodología propuesta por Singh y otros en 2017.⁽¹⁵⁾ La preparación de las muestras se realizó como se describe en el ensayo de inhibición de la formación de biopelícula. Como control se utilizó el medio de cultivo CTS-T (0,1 %) sin suspensión bacteriana. Después del periodo de incubación se tomaron alícuotas de 5 μ L que se aplicaron en forma de punción en placas de medio agar nutriente (AN) preparadas al 0,3 % (*swimming*) y al 0,5 % (*swarming*). Las placas se incubaron (incubadora Binder, BD 23) por 24 h a 36 °C. Los movimientos de *swimming* y *swarming* se evaluaron por los diámetros de crecimiento bacteriano y la turbidez en la placa.

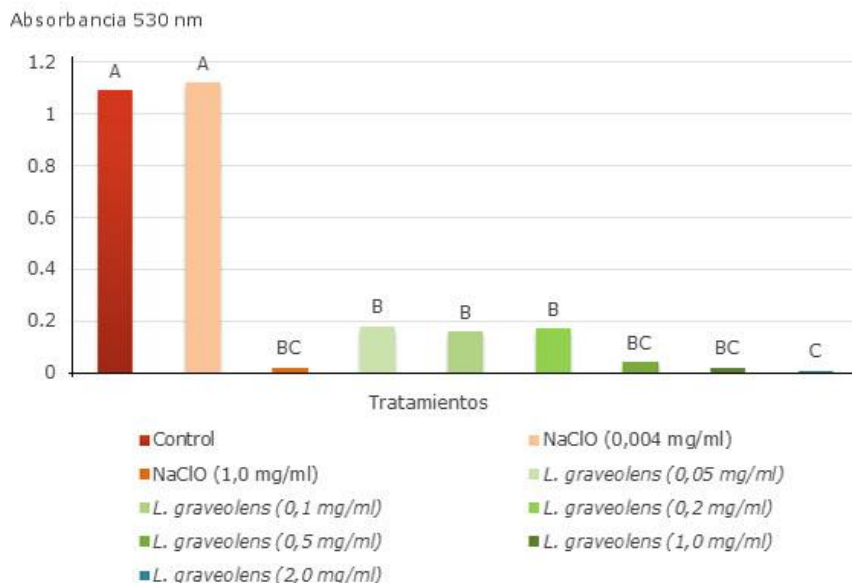
Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron como experimentos independientes por triplicado y los datos obtenidos se presentaron como los valores medios y el error estándar. Los resultados de absorbancia e IFB se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza simple. Las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significación del 5 %. Se utilizó el paquete estadístico InfoStat/L versión de 2018.⁽¹⁶⁾

Resultados

En este estudio, se observó un efecto de inhibición de la formación de biopelícula de *S. Typhimurium* dependiente de la concentración del aceite esencial de *L. graveolens* (Fig. 1). El aceite esencial de *L. graveolens* afecta la capacidad de formar biopelículas de *S. Typhimurium*

entre un 83-99 % en el rango entre 0,05-2,0 mg/mL. La CMIB fue de 0,5 mg/mL al corresponderse con un subcultivo negativo.



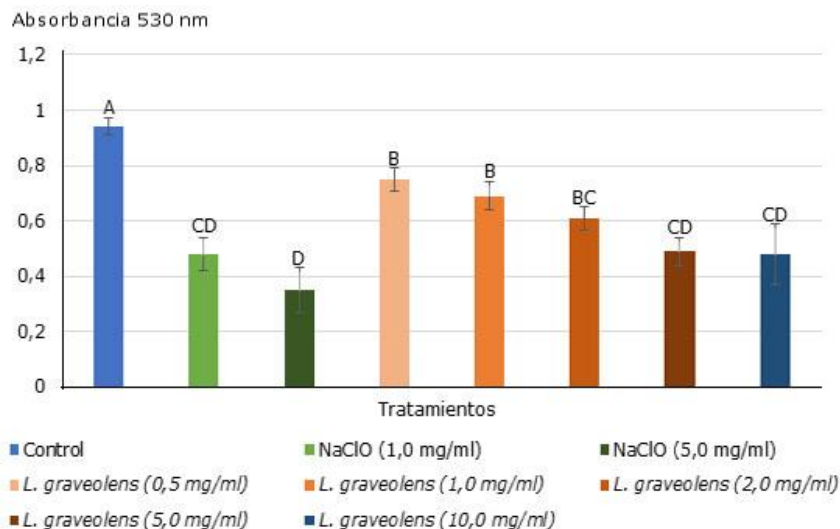
El hipoclorito de sodio (NaClO) se aplicó a la concentración para desinfección de superficies limpias (1,0 mg/mL) y a la concentración para desinfección de agua potable (0,004 mg/mL). Las barras de error muestran el error estándar de la media (n=6). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Fig. 1 - Capacidad de formación de biopelículas de células planctónicas de *S. Typhimurium* (Control positivo) y en presencia del aceite esencial de *Lippia graveolens* a 0,05-2,0 mg/mL.

La esencia de *L. graveolens* provoca un efecto inhibitorio en la formación de biopelículas similar a la producida por el hipoclorito de sodio a 1,0 mg/mL, con una reducción de un 98 %, a concentraciones mayores de 0,5 mg/mL. El control de NaClO a la concentración de desinfección de agua potable (0,004 mg/mL) no afecta la capacidad de formar biopelículas de células *S. Typhimurium*, por lo que constituye una alerta a los sistemas sanitarios en el que se emplea este agente químico para la desinfección de agua potable como medida alternativa en condiciones no idóneas.

La esencia de *L. graveolens* a concentraciones de 0,5-10 mg/mL destruye la biopelícula de *S. Typhimurium* preformada posterior a 24 h (Fig. 2). Esta esencia natural después de 24 h de tratamiento reduce significativamente la biopelícula *S. Typhimurium*. Fue superior para concentraciones mayores de 2 mg/mL en las que el efecto fue similar al obtenido para el hipoclorito

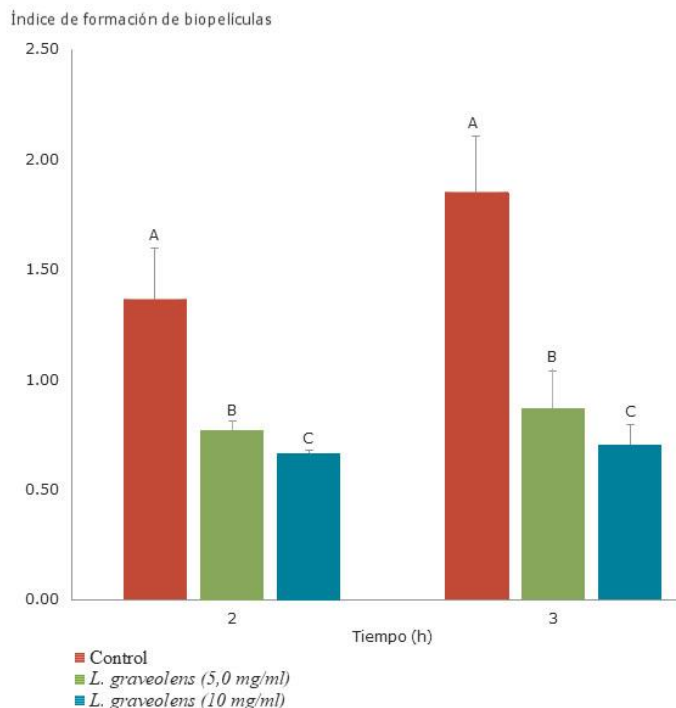
a la concentración para desinfección de superficies limpias (1,0 mg/mL) y a la concentración de desinfección de superficies sucias (5 mg/mL) según la OMS.⁽¹⁷⁾



El hipoclorito de sodio (NaClO) se aplicó a la concentración para desinfección de superficies limpias (1 mg/mL) y a la concentración de desinfección de superficies sucias (5 mg/mL). Las barras de error muestran el error estándar de la media (n=6). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Fig. 2 - Efecto del aceite esencial de *L. graveolens* en la destrucción de biopelículas preformadas de *S. Typhimurium* (Control) y después de tratado con el aceite esencial a 0,5-10,0 mg/mL.

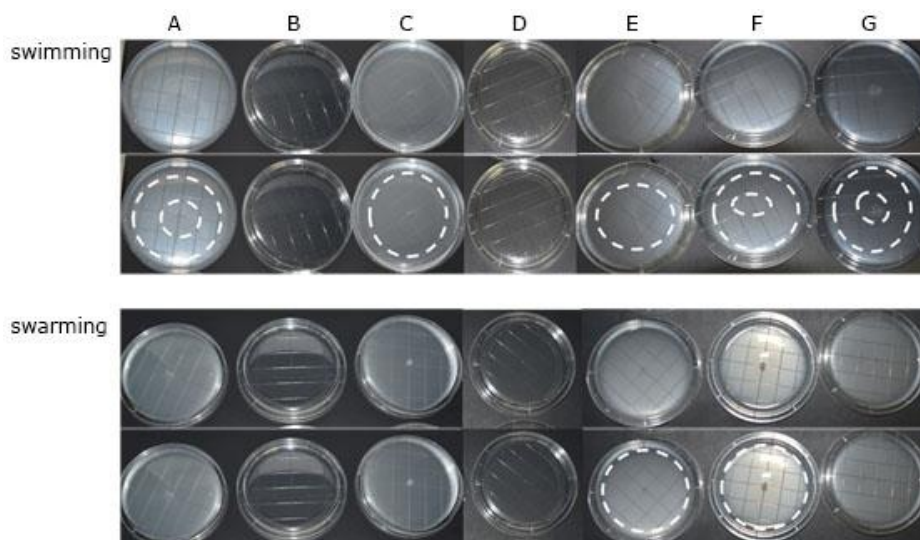
En un estudio de cinética se observó que el aceite esencial de *L. graveolens* a concentraciones de 10 mg/mL y 5 mg/mL, después de 2 h de tratamiento, reduce significativamente la biopelícula de *S. Typhimurium* (Fig. 3). La esencia natural convierte niveles de índice de formación de biopelículas que corresponden a una escala de fuerte a un nivel moderado según la escala de García-Heredia.⁽¹³⁾ Similar resultado fue observado después de 3 h de tratamiento, lo que sugiere un efecto sostenido para este tiempo. El control presentó valores de índice de formación superiores a 1,7, lo que indica la reducción de una potente biopelícula.



Las barras de error muestran el error estándar de la media (n=6). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Fig. 3 - Índice de formación de biopelícula de células de *S. Typhimurium* (Control) y después de ser tratado con el aceite esencial de *Lippia graveolens* durante 2 y 3 h.

El aceite esencial de *L. graveolens* a la CMIB (0,5 mg/mL) inhibe los desplazamientos bacterianos de *swimming* y *swarming* de células sésiles de *S. Typhimurium* remanentes (Fig. 4). Al igual que el tratamiento con NaClO a la concentración de desinfección de superficies (1 mg/mL) no se mostraron indicios de desplazamientos para las células sésiles. Esto reafirma el daño a la biopelícula bacteriana por acción de esta esencia. Sin embargo, a concentraciones inferiores a la CMIB no se observaron alteraciones en ambos desplazamientos.



A: Control; B: NaClO (1 mg/mL); C: NaClO (0,004 mg/mL); D-G: aceite esencial de *L. graveolens* a concentraciones 0,5; 0,2; 0,1 y 0,05 mg/mL.
Los círculos de líneas discontinuas denotan los anillos de la colonia que forma una monocapa (n=6).

Fig. 4 - Desplazamiento por *swimming* y *swarming* de células sésiles de *S. Typhimurium*.

Tanto en el control negativo como en las células tratadas con concentraciones inferiores a la CMIB se observaron ambos movimientos con el desplazamiento de las células de *S. Typhimurium* a través de la superficie del agar. En estos se identificó una colonia plana, lisa y sin rasgos distintivos en forma de monocapa. Este elemento coincide con lo descrito por *Chelvam* y otros en 2014⁽¹⁸⁾ para cepas de *S. Typhimurium*.

Discusión

Los resultados obtenidos con la esencia de *L. graveolens* cubana demuestran la inhibición de la formación de biopelículas en un 83 % a concentraciones 10 veces inferiores a la concentración mínima inhibidora (CMI) reportada por *Rubio* y otros en 2018.⁽³⁾ Datos similares se han informado para las esencias de *Origanum heracleoticum*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y *Thymus serpyllum* con inhibición al 50 % de la formación de biopelículas de *S. Enteritidis* a concentraciones cuatro veces inferior a la CMI.⁽¹¹⁾ Las esencias de *Origanum* y *Thymus* poseen carvacrol o timol como componente mayoritario, respectivamente. A estos dos compuestos se asocia de forma general la actividad sobre biopelículas. La esencia de *L. graveolens* de origen cubano posee

carvacrol y timol (22,2 y 42,7 %) por lo que la inhibición de la biopelícula puede estar asociada a la presencia de los mismos.

La CMIB coincidió con la CMI determinada en estudios anteriores.⁽³⁾ Este resultado es de gran importancia y a pesar de la connotación que posee este término en la práctica sobre la principal forma de vida bacteriana las determinaciones de CMIB no abundan. Se ha informado que aceites esenciales que poseen como compuestos mayoritarios carvacrol (59-70 %) requieren dos veces la CMI para obtener la CMIB sobre *S. Enteritidis*, mientras que en aceites donde abunda el timol (39-59 %) dos veces la CMI no fue suficiente para obtener la CMIB.⁽¹¹⁾ La mezcla de ambos compuestos en la esencia cubana así como componentes minoritarios pueden estar potenciando la acción sobre la biopelícula de *S. Typhimurium*.

La formación de la biopelícula bacteriana es un proceso dinámico complejo que involucra varios pasos. El aceite esencial de *L. graveolens* pudiera actuar en diferentes etapas del proceso de formación. Las estructuras como las fimbrias y pilis juegan un papel fundamental en la adhesión activa sobre la superficie durante la primera etapa de formación. Estas eliminan las barreras repulsivas superficiales, lo que permite su asentamiento en la superficie.⁽¹⁹⁾ De igual manera el flagelo contribuye en la transferencia bacteriana a un sitio específico de unión en la superficie. Los resultados obtenidos demuestran que el aceite esencial de *L. graveolens* a la CMIB inhibe la motilidad de *S. Typhimurium*, por lo que se afecta la colonización y adherencia a superficies como parte de la primera etapa de formación de biopelículas.

Por el contrario, para otros autores que reafirman la acción de los aceites esenciales como inhibidores del desplazamiento a concentraciones inferiores a la CMI⁽⁶⁾ la esencia cubana de *L. graveolens* no inhibe los movimientos de *swarming* y *swimming* a dosis inferiores a la CMI. Esto pudiera ser un mecanismo de defensa del microorganismo ante el estrés generado por el aceite para buscar un ambiente más propicio para su desarrollo.

Para la esencia de *L. graveolens* de plantas cultivadas en Cuba la CMEB y CMIB coincidieron en 0,5 mg/mL de manera similar la CMI y CMB. También concordaron en este valor sobre células de *S. Typhimurium*. Aunque los valores de CMEB y CMIB son gran interés para el desarrollo de productos, estos datos no abundan para un producto natural. Los resultados obtenidos resaltan el valor de los aceites esenciales teniendo en cuenta que desde 2002 *Olson* y otros⁽²⁰⁾ demostraron diferencias entre las CMI y la CMEB de 2 a 128 veces superiores para antibióticos sintéticos empleados en la medicina veterinaria para una cepa de *Salmonella* sp. aislada de cerdo.⁽²⁰⁾

La inhibición de la formación y la destrucción de biopelículas de la esencia de *L. graveolens* sobre la biopelícula bacteriana de *S. Typhimurium* también ha sido informada en los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Oreganum heracleoticum*, *Oreganum vulgare* sobre *S. Enteritidis*.^(11,21) Estas esencias poseen como componentes mayoritarios timol y carvacrol, ambos presentes en la esencia cubana (para una correspondencia de 64% en su conjunto), por lo que la acción de la esencia cubana de *L. graveolens* pudiera estar enmarcada en estos, aunque compuestos minoritarios pueden potenciar el efecto.

De forma general el aceite esencial de *L. graveolens* inhibe la formación de biopelículas de *S. Typhimurium* y a concentraciones inferiores a la CMIB no afecta los movimientos de desplazamiento por *swimming* y *swarming*. Además, esta esencia destruye biopelículas preformadas de *S. Typhimurium* sin la generación de células persistentes y coincidiendo los valores de CMIB con CMEB. El aceite de *Lippia graveolens* es un candidato promisorio para la desinfección de biopelículas de este patógeno. Otros estudios son necesarios para dilucidar el modo de acción sobre la biopelícula bacteriana, incluyendo estudios de señales del *quorum sensing*.

Agradecimientos

Agradecemos al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) por brindar las facilidades de investigación y en especial al grupo de Control de Calidad. El apoyo de los técnicos Cecil González y Dianelys Blanco fue indispensable para la culminación exitosa de este estudio. Además, se agradece la ayuda incondicional de la Dra. Amalia Núñez, de la Dra.C. Ileana Miranda y del Dr.C. Eduardo Sistach.

Referencias bibliográficas

1. Rivero I, Duarte G, Navarrete A, Bye R, Linares E, Mata R. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. J Food Sci. 2011;76(2):309-17. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02022.x>
2. Hernández AF, Antonio J, Herrera H, Medrano JI, Manuel L. Producción y extracción de aceite de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) bajo cultivo en la comarca lagunera. Rev Mex Cien. 2011

- [acceso: 06/08/2021];2(3). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322011000100009
3. Rubio Ortega A, Travieso Novelles M, Riverón Alemán Y, Peña Rodríguez J, Espinosa Castaño I, Pino Pérez O. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*. Rev Salud Anim. 2018 [acceso: 06/08/2021];40(3):1-10. Disponible en: <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/998>
4. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. Nat Rev Microbiol. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
5. Liu C, Sun D, Zhu J, Liu J, Liu W. The regulation of bacterial biofilm formation by cAMP-CRP: A mini-review. Front Microbiol. 2020;11:1-7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00802>
6. Rossi C, Chaves C, Serio A, Casaccia M, Maggio F, Paparella A. Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2020;0(0):1-20. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1851169>
7. Vidal De Oliveira DC, Fernandes Júnior A, Kaneno R, Silva MG, Araújo Júnior JP, Cirone Silva NC, *et al.* Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. Foodborne Pathog Dis. 2014;11(6). DOI: <http://doi.org/10.1089/fpd.2013.1710>
8. Cadena M, Kelman T, Marco M, Pitesky M. Understanding antimicrobial resistance (AMR) profiles of *Salmonella* biofilm and planktonic bacteria challenged with disinfectants commonly used during poultry. Foods. 2019 [acceso: 14/08/2019];8(275). DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8070275>
9. Cruz CD, Shah S, Tammela P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. BMC Microbiol. 2018;18(173):1-9. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1321-6>
10. Benachour H, Ramdani M, Lograda T, Chalard P, Figueredo G. Chemical composition and antibacterial activities of *Capparis spinosa* essential oils from Algeria. Biodiversitas. 2020;21(1):161-9. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210121>
11. Čabarkapa I, Čolović R, Đuragić O, Popović S, Milanov D, Pezo L. Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis. Biofouling. 2019;0(0):1-15. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1610169>

12. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. WHO. 2017 [acceso: 06/08/2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254637>
13. García Heredia A, García S, Merino Mascorro JÁ, Feng P, Heredia N. Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Food Microbiol. 2016;59:124-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.001>
14. Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua de consumo humano. 4th ed. OMS. 2018 [acceso: 06/08/2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272403>
15. Singh A, Gupta R, Tandon S, Pandey R. Thyme oil reduces biofilm formation and impairs virulence of *Xanthomonas oryzae*. Front Microbiol. 2017;8(JUN):1-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01074>
16. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.; 2018. Disponible en: <https://www.infostat.com.ar>
17. World Health Organization. Cleaning and disinfection of environmental surfaces in the context of COVID-19. World Heal Organ. WHO. 2020 [acceso: 06/08/2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332096>
18. Chelvam KK, Chai LC, Thong KL. Variations in motility and biofilm formation of *Salmonella enterica serovar* Typhi. Gut Pathog. 2014;6(2):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-2>
19. Lee CK, Anda J De, Baker AE, Bennett RR, Luo Y, Lee EY. Multigenerational memory and adaptive adhesion in early bacterial biofilm communities. PNAS. 2018;115(17):4471-6. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1720071115>
20. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res. 2002 [acceso: 06/08/2021];66:86-92. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC226988>
21. Sadekuzzaman M, Mizan FR, Kim H, Yang S, Ha S. Activity of thyme and tea tree essential oils against selected foodborne pathogens in biofilms on abiotic surfaces. LWT - Food Sci Technol. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.042>

Conflicto de intereses

Los autores refieren que no existen conflictos de intereses.

Contribuciones de autores

Conceptualización: Annie Rubio Ortega, Oriela Pino Pérez, Ivette Espinosa Castaño.

Curación de datos: Annie Rubio Ortega, Beatriz Álvarez Pita.

Análisis formal: María del Carmen Travieso Novelles.

Adquisición de fondos: Oriela Pino Pérez.

Investigación: Beatriz Álvarez Pita.

Metodología: Annie Rubio Ortega, Ivette Espinosa Castaño.

Administración del proyecto: Oriela Pino Pérez.

Supervisión: María del Carmen Travieso Novelles.

Validación: Ailin Martínez Vasallo.

Redacción del borrador original: Annie Rubio Ortega.

Redacción, revisión y edición: Ailin Martínez Vasallo, Oriela Pino Pérez, Ivette Espinosa Castaño.