

Evaluación de los componentes de aceites de pino y cítricos y bacteriófago específico contra el crecimiento de *Campylobacter* spp *in vitro*

Alma Gabriela Valle Henríquez

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Evaluación de los componentes de aceites de pino y cítricos y bacteriófago específico contra el crecimiento de *Campylobacter* spp *in vitro*

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Alma Gabriela Valle Henríquez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2013

Evaluación de los componentes de aceites de pino y cítricos y bacteriófago específico contra el crecimiento de *Campylobacter* spp *in vitro*

Presentado por:

Alma Gabriela Valle Henríquez

Aprobado:

Mayra Márquez, Ph.D.
Asesora Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Adela Acosta, Dra. C.T.A.
Asesora

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Evaluación de los componentes de aceites de pino y cítricos y bacteriófago específico contra el crecimiento de *Campylobacter* spp *in vitro*

Alma Gabriela Valle Henríquez

Resumen: El Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA, por sus siglas en inglés) implementó nuevos estándares de rendimiento para *Campylobacter*. La reducción en las canales de pollo de 1 log reduciría el riesgo para la salud pública entre 50 y 90% y por más de 2 log se reduciría el riesgo en más 90%. La industria de aves de corral y el Servicio de Inspección de Inocuidad de Alimentos (FSIS, por sus siglas en inglés) están continuamente examinando nuevas tecnologías de intervención de antimicrobianos para lograr una mayor reducción durante el procesamiento de aves de corral. Los objetivos de esta investigación son evaluar una variedad de compuestos de cítricos y de pinos, solos y en combinación con bacteriófago específico para determinar su eficacia y combinaciones más efectivas en contra de *Campylobacter*. Se evaluaron cepas de *Campylobacter*, a dichas cepas se les aplicaron los diferentes compuestos antimicrobianos y combinaciones de los mismos. Se hizo estudio de inhibición de crecimiento y medición de absorbancia en presencia de compuestos antimicrobianos por si solos, con las mejores combinaciones y en combinación con bacteriófagos específicos a tres diferentes temperaturas (4, 24 y 37 °C). Hubo un efecto positivo en la mayoría de los tratamientos con los compuestos a diferentes temperaturas, viendo mejor respuesta a 23 y 37 °C y en sinergismo con el coctel de tres bacteriófagos. Se necesita hacer más investigaciones para inhibir el crecimiento de los logaritmos necesarios dictados por el USDA.

Palabras Clave: Antimicrobiano, Inhibición, Sinergismo.

Abstract: The United States Department of Agriculture (USDA) implemented new performance standards for *Campylobacter*. If it is possible reduce *Campylobacter* in chicken carcasses for 1 log, significantly reduce the risk of public health from 50 to 90% and if it is possible reduce *Campylobacter* counts for more than 2 log, the public health risk reduce over 90%. The poultry industry and the Food Safety Inspection Service (FSIS) are exploring new technologies and antimicrobial treatments intervention to achieve a greater reduction in *Campylobacter* during poultry processing. The objectives of this research were to evaluate a variety of compounds of citrus and pine, alone and in combination with specific bacteriophage to determine their effectiveness and identify the combination more effective against the *Campylobacter* growth. Six strains of *Campylobacter* were evaluated against different antimicrobial compounds of citrus and pine oils and their combinations. The assays were disc diffusion plates measuring growth inhibition diameter, absorbance in the presence of antimicrobial oils by themselves, their combination and in combination with specific bacteriophage at three different temperatures (4, 24 and 37 °C). There was a positive effect on the majority of essential oils treatments at different temperatures, with a better response at 23 and 37 °C and in synergism with the three bacteriophage cocktail. More research needs to be done to decrease the necessary logs dictated by the USDA.

Keywords: Antimicrobial, Inhibition, Synergism.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen.....	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES	55
5. RECOMENDACIONES	56
6. LITERATURA CITADA.....	57
7. ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro		Página
1.	Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de <i>Campylobacter</i> spp. utilizando compuestos cítricos.....	11
2.	Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de <i>Campylobacter</i> spp. utilizando combinación de compuestos cítricos + Limonene.	12
3.	Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de <i>Campylobacter</i> spp. utilizando combinación de compuestos cítricos.	14
4.	Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de <i>Campylobacter</i> spp utilizando compuestos de pino.....	15
5.	Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de <i>Campylobacter</i> spp. utilizando aceites de pino + Limonene.	18
6.	Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de <i>Campylobacter</i> spp. utilizando combinación de compuestos de pino.	19
Figura		
1.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> utilizando aceites cítricos a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	21
2.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> 8 utilizando aceites cítricos a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	22
3.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> 10 utilizando aceites cítricos a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	23
4.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 3 utilizando aceites cítricos a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	24

5.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> L8 utilizando compuestos cítricos a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	25
6.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 2008 utilizando compuestos cítricos a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	27
7.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	28
8.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> 8 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	29
9.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> 10 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	32
10.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 3 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	33
11.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> L8 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	34
12.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 2008 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	35
13.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> utilizando compuestos de pino + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	37
14.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> 8 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	38
15.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> 10 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	39
16.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 3 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	40
17.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> L8 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C)	41

18.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 2008 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	42
19.	Comparación de un bacteriófago vs. Coctel de tres bacteriófagos contra seis cepas de <i>Campylobacter</i>	46
20.	Descripción de la adhesión del bacteriófago para tres cepas de <i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i> L8, <i>C. jejuni</i> 3 y <i>C. coli</i> 8) con intervalos de 10 minutos en 60 minutos totales a 7°C.....	47
21.	Descripción de la adhesión del bacteriófago para tres cepas de <i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i> L8, <i>C. jejuni</i> 3 y <i>C. coli</i> 8) con intervalos de 1 hora en 24 horas totales a 7°C.....	48
22.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de tres cepas de <i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i> L8, <i>C. jejuni</i> 3 y <i>C. coli</i> 8) utilizando el coctel de tres bacteriófagos a 37 °C.....	49
23.	Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> L8 utilizando compuestos cítricos + coctel de tres bacteriófagos a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	51
24.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 3 utilizando compuestos cítricos + coctel de tres bacteriófagos a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	52
25.	Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de <i>Campylobacter coli</i> 8 utilizando compuestos cítricos + coctel de tres bacteriófagos a tres temperaturas (4, 23, 37 °C).....	53

1. INTRODUCCIÓN

Campylobacter es un género perteneciente a la Familia Campylobacteraceae. Las especies de este género son bacilos Gram negativos, catalasa y oxidasa positivos. (Nannapaneni 2005, Scherer 2006, Stern 2007) *Campylobacter* spp posee un rango de temperatura de crecimiento de 37 a 42 °C y no es capaz de desarrollarse por debajo de los 30 °C (Lee *et al.*, 1998), sin embargo, se ha encontrado que posee actividad fisiológica a 4 °C (Hazeleger *et al.* 1998). La temperatura óptima para *C. jejuni* y *C. coli* es de 37 a 42 °C, lo cual probablemente refleja una adaptación al intestino de animales de sangre caliente (Vliet y Ketley, 2001). A pesar de su carácter termófilo, se ha encontrado que la muerte celular ocurre a 56-57 °C (Nguyen *et al.* 2006). *Campylobacter* es responsable por infecciones transmitidas por los alimentos que puede conducir a graves complicaciones de salud. Causa más de 600,000 enfermedades, y es responsable de un estimado de 55 muertes por año (Batz 2011). Aparece como una de las principales causas de transmisión de Enteritis alimentaria por *Campylobacter* (Nachamkin 1995). En Estados Unidos se sitúa como el tercer patógeno de transmisión alimentaria más prevalente justo detrás de *Salmonella* y *Toxoplasma*. En términos de costo, las infecciones por *Campylobacter* causan un costo de \$1.7 millones de dólares al año (Batz 2011). *Campylobacter* también es clasificado por el Centro para el control y prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) como la tercera causa de enfermedad bacteriana transmitida por los alimentos, causando más de 20 casos de enfermedad por cada 100.000 personas, por año (Wassenaar y Blaser 1999).

En julio de 2011 el USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, por sus siglas en inglés) implementó nuevos estándares para *Campylobacter*. El estándar de *Campylobacter* en pollos jóvenes requiere una reducción de la prevalencia de canales contaminadas ya que se considera un contaminante natural de pollos vivos. Esto sirve para asegurar la disminución del riesgo de contraer enfermedades causadas por *Campylobacter* a la población, es un método para tratar de reducir su prevalencia. El Servicio de Inspección e Inocuidad de Alimentos (FSIS, por sus siglas en inglés) no debe encontrar más de ocho muestras positivas en un conjunto de 51 muestras de pollos jóvenes y tres muestras positivas en un conjunto 56 muestras para pavos jóvenes. El estándar de *Campylobacter* en pollos jóvenes requiere una reducción en la prevalencia de canales contaminadas con altos niveles de *Campylobacter* (es decir, detectable en un ml de agua de enjuague). De acuerdo con algunos informes de investigación, de 90 a 100% del pollo crudo vendido en los mercados al por menor, están contaminado por *Campylobacter*. (Guerin *et al.* 2010). La operación de desplumado en el procesamiento del pollo aumenta la prevalencia y concentración de *Campylobacter* en las canales. El consumo de carne de pollo poco cocida puede contener *Campylobacter* (Krameret 2000). En la actualidad, la

reducción de los patógenos transmitidos por los alimentos durante poscosecha y procesado de las canales crudas, se consigue mediante el uso de un amplio espectro de agentes desinfectantes y antimicrobianos tales como fosfato trisódico, sulfato de calcio acidificado, ácidos orgánicos (por ejemplo, láctico y acético) y cloruro de acetil piridinio (Kemp 2000, Arritt 2002, Ricke 2003, Ricke 2005, Oyarzabal 2005). Aunque su uso en el procesamiento de las aves crudas es aprobado para algunos, estos productos sintéticos y químicos no cumplen con lo que los consumidores demandan cada vez más, productos frescos de forma más natural siempre manteniendo la seguridad microbiológica (Gould 1996, Olasupo 2003).

Los aceites cítricos son mezclas complejas de compuestos naturales (aproximadamente 400 compuestos) que han sido propuestas como nuevos antimicrobianos (Dorman y Deans 2000, Oussalah 2006), los aceites cítricos han sido parte de la dieta humana, por lo tanto han sido generalmente reconocidos como inocuos por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés). Los componentes individuales de aceites de cítricos han demostrado actividad antimicrobiana frente a los principales patógenos transmitidos por los alimentos (Olasupo 2003, Fisher y Phillips 2006, Fisher 2007).

Fisher y Phillips (2006) investigaron la eficacia de los aceites y vapores de las especies de cítricos incluyendo limón, naranja dulce y bergamota contra varios patógenos comunes, incluyendo *C. jejuni*. Se encontró que el aceite de bergamota era más inhibitorio de los aceites esenciales y dos de los componentes del aceite de bergamota (citral y linalool) produjeron efectos similares a los del aceite entero. Bacterias Gram-positivas fueron más susceptibles que las bacterias Gram negativas *in vitro*, aunque *C. jejuni* fue inhibida por sólo los vapores de aceites de bergamota (citral y linalool). Hay compuestos que poseen propiedades antibacterianas fuertes que son los compuestos fenólicos, tales como eugenol (clavo, hojas de canela) ácido cinámico (chile, canela, corteza), carvacrol (orégano) timol (tomillo) o Terpenos (pinos y cítricos) (Burt 2004, Holley y Patel 2005) por lo tanto, tienen un mecanismo de acción antimicrobiana. Los aceites esenciales de las plantas son generalmente mezclas de diferentes componentes.

Para identificar los componentes de los aceites cítricos y de pino a utilizarse fue necesario revisar los extractos fenólicos más utilizados en la industria como mejores agentes antimicrobianos de amplio espectro, formulaciones puras o mezclas (Klancnik *et al.* 2009, Lipoglavsek 2010, Mozina 2009). Se utilizan discos de papel en superficies de agar sistemas de placas de micropocillos que contienen inhibidores y microorganismos en caldo (Dormand y Deans 2000; Burt 2004). La hidrofobicidad de los aceites esenciales son para estimar con precisión la potencia antimicrobiana de los mismos (Holley y Patel 2005). Varias sustancias se han utilizado para disolver los aceites esenciales o para estabilizarlos en medios de cultivo en base de agua, tales como etanol, metanol, Tween-20, Tween-80, acetona, glicol de polietileno, propileno glicol, n-hexano, dimetilsulfóxido o agar (Burt 2004). No se encontraron mejoras en la eficacia de los aceites esenciales ni influencia en la reducción de las cepas de *Campylobacter* usando alguna de estas sustancias, de acuerdo con otros investigadores, como Smith- Palmer *et al.* (1998) Dorman y Decanos (2000) o Elgayyar *et al.* (2001).

Los métodos utilizados para medir eficiencia de los compuestos antimicrobianos son varios, uno de los métodos es la determinación de la concentración mínima inhibitoria, es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. Esta es importante en diagnósticos para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorear la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos (Goode *et al.* 2003^a).

Las concentraciones mínimas inhibitorias pueden ser determinadas mediante métodos de micro dilución en caldo, normalmente siguiendo las directrices de centros de referencia tales como el Instituto Estándar de Laboratorio Clínico (CLSI, por sus siglas en inglés) Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC, por sus siglas en inglés) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (UCAST, por sus siglas en inglés) (Patel 2005).

Entre los métodos uno de los más importantes es el método de Kirby Bauer, este método de difusión se basa en que el compuesto a estudiar se difunde en discos sobre el medio agarizado produciendo un gradiente de concentración, si el compuesto es efectivo contra el microorganismo probado se formará una zona de inhibición alrededor del disco embebido del compuesto. El tamaño de la zona de inhibición proporciona indicios de la relativa actividad antimicrobiana de la sustancia. Los resultados se obtienen como inhibición del crecimiento, a todo halo translúcido detectado alrededor del disco, es decir que la bacteria es sensible al compuesto, no inhibición del crecimiento, es decir que no se forma halo y la bacteria no es sensible e inhibición del crecimiento en forma irregular, es decir que se observa una inhibición pero el halo no adopta la forma esperada (Burt 2004).

Como manera natural de inhibir el crecimiento de patógenos en los alimentos también han sido propuestos diferentes alternativas como los bacteriófagos. Los bacteriófagos al igual que los virus infectan células eucariotas, están constituidos por una cubierta proteica o cápside en cuyo interior está contenido su material genético, que pueden ser moléculas de ADN o ARN rodeadas por una envoltura proteica que necesitan células viables para poder replicarse. Los virus utilizan la maquinaria metabólica de las células del hospedero para sintetizar su material genético y proteínas de la envoltura. Existen distintos tipos de virus que pueden infectar células procariotas o células eucariotas. El genoma de los bacteriófagos puede ser ARN de simple cadena o de doble cadena y ADN de simple cadena o doble cadena (Goode *et al.* 2003 b).

Los bacteriófagos pueden ser encontrados en diversas poblaciones de bacterias, tanto en el suelo como en la flora intestinal de los animales. También han sido propuestos como una manera natural de inactivar patógenos, la literatura describe la aplicación de control con bacteriófagos como controlador de agentes patógenos de transmisión alimentaria. Inactivación de *Campylobacter jejuni* con bacteriófagos ha sido efectivo de un 95-99% (Atterbury *et al.* 2003, Goode *et al.* 2003 a).

Los objetivos de esta investigación fueron:

- Evaluar la eficacia de compuestos antimicrobianos a base de pino y cítricos para la reducción de *Campylobacter* spp.
- Evaluar eficacia de combinaciones de antimicrobianos a base de pino y cítricos para la reducción de *Campylobacter* spp.
- Evaluar el uso de bacteriófagos solos y en combinación con cítricos para el control de *Campylobacter* spp.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del ensayo. El estudio se realizó en el Laboratorio de Biomasa y Microbiología de la Universidad de Arkansas, en el departamento de Ciencia de Alimentos, localizada en Fayetteville, Arkansas, Estados Unidos de América. El proyecto fue “Reducción de la prevalencia de *Campylobacter spp in vitro* utilizando aceites de pino y cítricos y bacteriófago específico”, supervisado por la Dra. Kristen Elizabeth Gibson.

Diseño experimental. Se utilizó el programa estadístico SAS® versión 9.3, se realizó un Diseño Completamente al azar (DCA) para cada una de las secciones con variaciones entre cada una, en la primera se llevó a cabo un factorial de 6×6×4 (6 cepas, 6 aceites cítricos y 4 aceites de pino) con tres repeticiones. Para la segunda sección se llevaron a cabo dos medidas repetidas en el tiempo (0 y 24 horas) y dos repeticiones, así como también para la tercera sección se utilizaron tres medidas repetidas en el tiempo (0, 3 y 24 horas) con dos repeticiones, separación de medias Duncan y LS means, con un nivel de significancia de 0.05. En cada sección se encuentra detallado el diseño experimental que se utilizó.

Materiales. Medio Agar Bolton sangre (Medio sólido y caldo), medio NZCYM. (Tryptona, extracto de levadura, NaCl, ácidos de Casamino y MgSO₄), DMSO (Dimetilsulfóxido) fue utilizado como blanco al leer absorbancia (Densidad óptica).

Cepas bacterianas. **1.** *Campylobacter coli* # 10 (ATCC 43486), **2.** *Campylobacter coli* # 8 (ATCC 33559), **3.** *Campylobacter jejuni* # 3 (ATCC 33560), **4.** *Campylobacter coli*, **5.** *Campylobacter jejuni* L8, **6.** *Campylobacter jejuni* 2008.

*Las últimas tres cepas fueron facilitadas por el Laboratorio de salud de Aves de Corral, Universidad de Arkansas.

Compuestos de aceites de cítricos. **1.** Dodecil aldehído (Sigma-Aldrich), **2.** Valenceno (Sigma-Aldrich), **3.** Citral (Sigma-Aldrich), **4.** Decanal (Sigma-Aldrich), **5.** Alfa-Terpineol (Sigma-Aldrich), **6.** (S) - (-)-Citronelal (Sigma-Aldrich), **7.** (1)-Linalool (Sigma-Aldrich)

Compuestos de pino estándar. **1.** (1S) - (-)-β-pineno, 99% (Alfa Aesar), **2.** Terpeneol (Spectrum), **3.** Alfa-pineno, 97% (Acros Organics), **4.** 3-Carene, 90% (Acros Organics)

Equipo. Incubadora a 37 °C, refrigeradores a 4 °C, placas, discos de papel para prueba de difusión (Becton, Dickinson and Company), cámara anaeróbica de 7.0 L de capacidad (AnaeroPack Sistema, Mitsubishi Gas Chemical), placas de 96 pocillos de microtitulación (Thermo Fisher Scientific), pipeta, varillas, tubos de ensayo, gases (N, O, CO₂).

Cultivos de Bacterias. Los inóculos de *Campylobacter* fueron preparados por dilución de cultivo durante una noche, mediante la adición de 5 ml en de BHI (Infusión de cerebro y corazón) tomando colonias crecidas de placas con medio Agar Bolton sangre de menos de 24 horas de incubación. Los cultivos fueron incubados a 42 °C durante cuatro horas bajo un ambiente microaeróbico utilizando una cámara anaeróbica (AnaeroPack Sistem, Mitsubishi Gas Chemical) para alcanzar una concentración final de 10⁶ UFC/ml.

Sección 1. Prueba de difusión en disco. Cada prueba de difusión en disco se realizó por triplicado. Los platos Petri que contenían medio Agar Bolton sangre fueron inoculados por la difusión del inóculo, las cuales fueron antes aisladas con una concentración de 10⁶ UFC/ml de cepas que fueron crecidas previamente y aisladas en medio de BHI (Infusión de cerebro y corazón) y almacenados en el laboratorio bajo condiciones de congelación a -70 °C. Las distintas especies de *Campylobacter* fueron descongeladas para poder sembrarlas en los platos. La suspensión de bacterias se dejó secar durante 3 a 5 minutos. Se colocaron asépticamente discos estériles de papel blanco Whatman a prueba de difusión de 6 mm de diámetro (Becton, Dickinson and Company) (un disco por placa en el agar). Los tratamientos con los componentes de aceites esenciales sin diluir fueron aplicados por medio de pipetas asepticas en los discos, (10 µl por disco) Se dejó secar en un período de tiempo de 15 min para que los aceites se absorbieran y difundieran.

Las placas fueron invertidas e incubadas en la cámara anaeróbica de 7.0 L de capacidad (AnaeroPack Sistema, Mitsubishi Gas Chemical) en condiciones de microaeróbicas, (5% de oxígeno, 10% de CO₂ y 85% de nitrógeno) a 37 °C durante 24 h.

El diámetro de inhibición de crecimiento (*ZI, mm) se midió en milímetros con una regla y se registró.

*ZI: zona clara alrededor del disco.

Ensayo de difusión en Disco. Utilizando la técnica de difusión en disco (descrita anteriormente) se probaron las siguientes combinaciones de aceites:

Combinaciones de aceites de pino. 1. (1S) - (-)-β-pineno + Terpineol, 2. Alfa-pineno + Terpineol, 3. 3-Carene + Terpineol, 4. (1S) - (-)-β-pineno + Alfa-pineno, 5. (1S) - (-)-β-pineno + 3-Carene, 6. 3-Carene + Alfa-pineno.

El diámetro de inhibición de crecimiento (*ZI, mm) se midió en milímetros con una regla y se registró.

*ZI: zona clara alrededor del disco

Análisis estadístico. Para el Análisis Estadístico del estudio se utilizó el programa estadístico SAS® Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 6×6×4 (6 cepas, 6 aceites cítricos y 4 aceites de pino) con tres repeticiones, con separación de medias Duncan y un nivel de significancia de 0.05.

Sección 2. Ensayo de concentración inhibitoria de crecimiento. Cada prueba se realizó por duplicado. Los compuestos esenciales no son solubles en agua, por lo que fue necesario emulsionar los compuestos de los aceites y mantenerlo estable en solución de DMSO (Dimetilsulfóxido) que se utilizó como solvente durante la prueba.

Los valores de este ensayo se determinaron por los componentes de los compuestos de cítricos, de pino, y el limonene que tuvieron una de las mejores zonas positivas y limpias alrededor del disco en el ensayo de difusión en discos. La placa plana y estéril de 96 pocillos de microtitulación (Thermo Fisher Scientific) fue utilizada para determinar la concentración inhibitoria de crecimiento de los mejores fitoquímicos que fueron previamente estudiados en el ensayo previo. El bioensayo micro-placa fue preparado dispensando en cada pocillo 100 µl de caldo Bolton mezclado con el inóculo de *Campylobacter* previamente estandarizado. Fueron transferidos 100 µl de la solución fitoquímico (5% compuestos de aceites esenciales/Dimetilsulfóxido (DMSO)) en cada pocillo. El volumen final en cada pocillo fue de 200 µl. El último pocillo contenía 200 µl totales de caldo Bolton mezclado con el inóculo de la bacteria y se utilizó como control positivo (cepa viable). Las placas de microtitulación fueron incubadas asépticamente en la cámara anaeróbica en condiciones microaeróbicas a diferentes temperaturas: 4 °C, 23 °C, y 37 °C. Se midieron a las 0 y después de 24 horas, las placas se colocaron en el Espectrofotómetro Tecan (Tecan, Infinite M200) para medir la densidad óptica a 600 nm (DO600nm). La prueba fue realizada por duplicado.

Análisis estadístico. Para el Análisis Estadístico del estudio se utilizó el programa estadístico SAS®. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con dos medidas repetidas en el tiempo (0 y 24 horas) y dos repeticiones, con separación de medias Duncan y LS means, con un nivel de significancia de 0.05.

Sección 3. Efectos *Campylobacter* en combinación con bacteriófago y con compuestos cítricos. Cada prueba se realizó por duplicado. Se utilizaron bacteriófagos líticos específicos para *Campylobacter* spp aislados de muestras de aves de corral en el laboratorio de Biomasa y Microbiología y en el Laboratorio de salud de Aves de Corral del departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Arkansas.

Un subconjunto de estos fagos se ha caracterizado además por microscopía electrónica de transmisión con el fin de clasificar los fagos en la familia del virus apropiado. Sobre la base de estos análisis, una colección de fagos de ADN de cadena doble se catalogó y utilizó. Las seis cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, fueron utilizadas cada una individualmente en todas las pruebas sin hacer mezclas de las mismas.

Se combinó con Bacteriófagos específicos de *Campylobacter*, en diferentes multiplicidades de infección (MDI) con el fin de evaluar los posibles efectos sinérgicos entre el fago y componentes de aceites cítricos.

Absorción del fago. Previamente aislado y caracterizado el fago específico para *Campylobacter* fue evaluado para determinar las propiedades de absorción que ayuda en la selección de fagos para los pasos posteriores.

Según lo descrito por Hwang (2009), Los bacteriófagos aislados fueron conservados en medio Infusión de cerebro y corazón (BHI) suplementado con MgSO₄ y CaCl₂ a concentraciones de 10 mM y 1 mM respectivamente (BHI-MC). Al aislamiento de fagos se le añadió la suspensión celular de microorganismo hospedero (*Campylobacter*) de 0.1 ml (1x10⁷UFC/ml) y se incubaron a 37 °C por una hora para permitir la absorción de los bacteriófagos a las células bacterianas (*Campylobacter*) a una concentración final de 1x10⁸UFC/ml. Se centrifugaron y se lavaron en tampón fosfato salino (PBS). En el tiempo 0 y cada 10 minutos durante 1 hora, las suspensiones de bacterias-fagos fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 10 min y el número de virus en el sobrenadante se determinó por el ensayo de placa, estos bacteriófagos son cosechados y conservados a 4°C con glicerol para su mejor sobrevivencia.

Brevemente, las colonias de *Campylobacter* se recogieron en 5 ml de BHI-MC para obtener una lectura de densidad óptica de 0.350 nm. y se incubaron durante cuatro horas a 37 °C. A continuación, 100 µl del sobrenadante previamente centrifugado se añadió a 400 µl de *Campylobacter* que fue incubado por cuatro horas en suspensión celular y se incubó a 42 °C en condiciones microaeróbicas. El sobrenadante – mezcla de *Campylobacter* se añadió con 5 ml de caldo NZCYM con 5% de agar que se mantuvo líquido por medio de baño maría a 48 °C, esta mezcla de sobrenadante-*Campylobacter* y medio NZCYM líquido se vertió en NZCYM agar en placas, se dejó secar y se incubó a 37 °C durante 48 horas bajo condiciones microaeróbicas, los resultados fueron leídos a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, y 60 minutos y también a las, 0, 1, 2, 3, 4, 5, y 24 horas para observar a que tiempo fue la mejor adhesión, se revisaron las placas y los resultados fueron reportados en Unidades Formadoras de Placa (UFP/ml).

Fago - ensayo en placa. Fue evaluada una mezcla de fagos específicos por la actividad lítica contra las cepas de *Campylobacter*. El primer fago se evaluó en combinaciones de dos, seguidos por combinaciones de no más de cuatro fagos. Estas combinaciones se seleccionaron basándose en las características de absorción del fago. El número de UFP fue generado por cada mezcla de fagos basado en el método de la placa de ensayo (descrito anteriormente). Las combinaciones de fagos que exhibieron la mayor actividad lítica (es decir, producir mayor número y tamaño de UFP) se evaluaron en combinación con los aceites de pino y cítricos.

Fago - medios líquidos. Se determinó la inhibición del crecimiento bacteriano por el fago en medios líquidos. Se cosecharon colonias de *Campylobacter* con una concentración de 1x10⁶ UFC/ml y fueron crecidas previamente en Agar Bolton sangre y almacenadas a temperatura de congelación a -70 °C. Fueron descongeladas y lavadas en se lavaron en tampón fosfato salino (PBS) y se añadió a BHI-MC a una densidad celular final de 1x10⁸. La suspensión de células se incubaron durante 1 hora a 37 °C seguido de la adición de la mezcla de fagos (MDI = 0.1). En los puntos de tiempo específicos (por ejemplo, tiempo 0 seguido por cada hora durante cinco horas, luego a 24 horas), se obtuvo la densidad óptica de la muestra a 600 nm y luego la misma muestra se procesó sobre sedimento celular y se analizó mediante ensayo en placa para la determinación de UFP. Cada ensayo se repitió tres veces para cada cepa de *Campylobacter* y las muestras fueron analizadas por duplicado.

Coctel de fagos y compuestos de pino y cítricos. Antes de comenzar esta fase del análisis, fue determinada la viabilidad del coctel de fagos en concentraciones variables de compuestos seleccionados de aceites esenciales. Brevemente, el coctel de fagos y los aceites esenciales fueron incubados a temperatura de refrigeración a 4 °C y la supervivencia del fago fue determinada por el ensayo en placa, la serie de diluciones en solución de PBS y la combinación de 100 µl de fago - alícuota de aceites esenciales con 400 µl de células de *Campylobacter* como se describió anteriormente. La mezcla de los Fagos y DMSO sirvió como control negativo.

Para evaluar el efecto combinado antimicrobiano de los fagos y los compuestos de aceites esenciales contra *Campylobacter* fue evaluar los compuestos utilizando la aplicación de fago seguido de un tratamiento combinado con los aceites esenciales cítricos. Para este paso, primero fue evaluado la eficacia de los compuestos *in vitro*. Las cepas de *Campylobacter* fueron preparadas como se ha descrito anteriormente.

Análisis estadístico. Para el Análisis Estadístico del estudio se utilizó el programa estadístico SAS® Se utilizo un diseño completamente al azar (DCA) con tres medidas repetidas en el tiempo (0, 3 y 24 horas) con dos repeticiones, separación de medias Duncan y LS means, con un nivel de significancia de 0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sección 1. Ensayo de difusión en disco. En el análisis de diámetro de inhibición en milímetros con compuestos cítricos para cada una de las seis cepas de *Campylobacter* mostraron los mejores tratamientos. Las cepas que respondieron mejor a los tratamientos fueron *C. coli* 8, *C. coli* 10, *C. jejuni* L8, y *C. jejuni* 2008 presentando mayor susceptibilidad en la mayoría de los tratamientos con diámetros de inhibición de entre 20 a 58 mm. El compuesto A. Terpineol tuvo el mayor efecto positivo en contra del crecimiento de la mayoría de las seis cepas con diámetros de entre 23 hasta 58 mm éste actuó en cinco cepas efectivamente. También fueron efectivos los compuestos Decanal y Citral con diámetros de entre 15 a 43 mm y de 16 a 43 mm respectivamente. Actuando en cuatro de seis cepas. Los demás compuestos tuvieron diámetros por debajo de éstos, cada cepa respondió diferente a cada tratamiento. Las cepas con mayor resistencia a fueron *C. coli* respondiendo únicamente a un compuesto (A. Terpineol) con diámetro de 54 mm y *C. jejuni* 3 respondió a dos compuestos (Citral y Decanal) con diámetros de 16 y 37 mm respectivamente (Cuadro 1).

El compuesto antimicrobiano de mayor actividad de los aceites esenciales se atribuye a más de un mecanismo de acción como el contenido de compuestos fenólicos y la estructura del compuesto en sinergismo con la composición de la bacteria (Burt 2004 y Moreira 2005). La alta actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-negativas podría ser debido a la presencia de grupos hidroxilo en compuestos de los aceites esenciales (Elgayyar *et al.* 2001, Burt 2004, Oussalah *et al.* 2006, Delamare *et al.* 2005).

En las combinaciones de compuestos cítricos + Limonene, los compuestos que tuvieron el mayor diámetro de inhibición contra el crecimiento de las seis cepas fueron A. Terpineol + Limonene, Citronellal + Limonene y el Limonene por sí solo, tuvieron el mayor efecto positivo contra la mayoría de las cepas con un diámetros de entre 17 y 20 mm 15 y 30 mm y 12 a 16 mm cada uno. Las demás combinaciones tuvieron diámetros por debajo de éstos. Las cepas que respondieron efectivamente a los tratamientos fueron *C. coli* que respondió a los compuestos A. Terpineol + Limonene con 19 mm de diámetro, y 12 mm de Limonene, *C. coli* 10 respondió a Citronellal + Limonene con 15 mm *C. jejuni* 3 respondió a A. Terpineol con diámetro de 20 mm y *C. jejuni* L8 respondió a Citronellal + Limonene y Limonene con 33 y 16 mm respectivamente. *C. jejuni* 2008 con A. Terpineol + Limonene y Limonene con 17 y 13 mm respectivamente. La cepa con mayor resistencia a los tratamientos de aceites cítricos antimicrobianos fue *C. coli* 8 ya que no respondió a ninguno de los tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 1. Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de *Campylobacter* spp. utilizando compuestos cítricos.

	COMPUESTOS CÍTRICOS					
	D. Aldehyde	Valencene	Citral	Decanal	A. Terpeneol	Citronellal
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
CEPAS						
<i>C. coli</i>	6.00 ± 0.00 ^{Cx}	6.00 ± 0.00 ^{Bx}	6.00 ± 0.00 ^{Dx}	6.00 ± 0.00 ^{Cx}	54.00 ± 5.29 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Ax}
<i>C. coli</i> 8	27.66 ± 2.51 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Bz}	50.00 ± 8.66 ^{Bw}	43.33 ± 2.88 ^{Ax}	23.33 ± 2.88 ^{Cy}	6.00 ± 0.00 ^{Az}
<i>C. coli</i> 10	11.00 ± 3.60 ^{By}	6.00 ± 0.00 ^{Bz}	6.00 ± 0.00 ^{Dz}	19.00 ± 3.60 ^{Bx}	37.00 ± 2.64 ^{Bw}	6.00 ± 0.00 ^{Az}
<i>C. jejuni</i> 3	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	6.00 ± 0.00 ^{By}	16.33 ± 3.51 ^{Cx}	37.33 ± 2.51 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Dy}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}
<i>C. jejuni</i> L8	6.00 ± 0.00 ^{Cz}	51.66 ± 7.63 ^{Aw}	15.33 ± 2.51 ^{Cy}	35.00 ± 5.00 ^{Ax}	37.67 ± 2.51 ^{Bx}	6.00 ± 0.00 ^{Az}
<i>C. jejuni</i> 2008	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	6.00 ± 0.00 ^{By}	62.00 ± 2.64 ^{Aw}	22.33 ± 2.51 ^{Bx}	58.67 ± 1.52 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}
CV (%)	10.06%	R ²	0.98			

Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna (A-D) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) y letras minúsculas diferentes en cada fila (w-z) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Diámetros iguales a 6 no se consideran inhibitorios.

* Zona de Inhibición.

Cuadro 2. Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de *Campylobacter* spp. utilizando combinación de compuestos cítricos + Limonene (L).

	COMPUESTOS CÍTRICOS + LIMONENE						
	D. Aldehyde + L	Valencene + L	Citral + L	Decanal + L	A. Terpeneol + L	Citronellal + L	Limonene
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
CEPAS							
<i>C. coli</i>	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	19.66 ± 1.52 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	12.33 ± 1.52 ^{Bx}
<i>C. coli 8</i>	6.00 ± 0.00 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Cw}	6.00 ± 0.00 ^{Cw}	6.00 ± 0.00 ^{Cw}
<i>C. coli 10</i>	6.00 ± 0.00 ^{Ax}	6.00 ± 0.00 ^{Ax}	6.00 ± 0.00 ^{Ax}	6.00 ± 0.00 ^{Ax}	6.00 ± 0.00 ^{Cx}	15.33 ± 2.51 ^{Bw}	6.00 ± 0.00 ^{Cx}
<i>C. jejuni 3</i>	6.00 ± 0.00 ^{Ax}	6.00 ± 0.00 ^{Ax}	6.00 ± 0.00 ^{Ax}	6.00 ± 0.00 ^{Ax}	20.33 ± 1.52 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Cx}	6.00 ± 0.00 ^{Cx}
<i>C. jejuni L8</i>	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	33.67 ± 4.04 ^{Aw}	16.00 ± 1.73 ^{Ax}
<i>C. jejuni 2008</i>	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	6.00 ± 0.00 ^{Ay}	17.00 ± 1.73 ^{Bw}	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	13.33 ± 1.52 ^{Bx}
CV (%)	10.35%		R ²		0.98		

Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna (A-D) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) y letras minúsculas diferentes en cada fila (w-z) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Diámetros iguales a 6 no se consideran inhibitorios.

* Zona de Inhibición.

En cambio las combinaciones de compuestos cítricos entre sí muestran que fueron efectivos D. Aldehyde + Citral (el cual mostró diámetros mayores en comparación a las demás combinaciones) D. Aldehyde + Decanal y D. Aldehyde + A. Terpeneol, con diámetros mayores a 20 mm ambas combinaciones. Las demás combinaciones tuvieron un promedio por debajo de éstos. Las cepas que respondieron efectivamente fueron *C. coli* 10 con diámetros de mayores a 18 mm respondiendo a cinco tratamientos, *C. jejuni* L8 con diámetros mayores a 25 mm respondiendo a cuatro tratamientos, al igual que *C. jejuni* 2008 con diámetros mayores a 10 mm Las cepas con mayor resistencia a las combinaciones fueron *C. coli*, *C. coli* 8 y *C. jejuni* 3, ya que mostraron mayor resistencia a los tratamientos presentando menor respuesta positiva y diámetros menores a los antes mencionados (Cuadro 3).

Algunos estudios han llegado a la conclusión de que todo aceite esencial tiene una mayor actividad antibacteriana de los componentes principales mezclados (Gill *et al.* 2002, Mourey y Canillac 2002). Burt (2004) sugirió que los componentes menores presentes en los extractos de aceites esenciales son más críticos para la actividad de microorganismos en componentes principales de aceites esenciales mezclados, y pueden tener efectos sinérgicos o potenciadores, en este caso se observó mejor respuesta en las combinaciones de aceites cítricos entre sí, ya que hubo mayor efecto antimicrobiano a la mayoría de las cepas, ya que estas respondieron a la mayoría de las combinaciones con diámetros mayores a las demás combinaciones con Limonene o aceites por sí solos.

En los compuestos pino que tuvieron el mayor diámetro de inhibición contra *Campylobacter* fueron A. Pinene, Pinene (actuó efectivamente en cinco cepas pero con diámetros pequeños) y Terpeneol (actuó en tres cepas con diámetros de más de 25 mm). Las demás combinaciones tuvieron un promedio por debajo de éstos. Las cepas que respondieron efectivamente a los tratamientos fueron *C. coli* 8 respondiendo a tres tratamientos (Pinene, A. Pinene y Carene) con diámetros mayores a 9 mm al igual que *C. jejuni* L8 con diámetros de más de 12 mm, *C. jejuni* 2008 respondió a cuatro tratamientos (Pinene, Terpeneol, A. Pinene y Carene con diámetros de más de 11 mm. Las cepas con mayor resistencia a las combinaciones fueron *C. coli*, *C. coli* 10 y *C. jejuni* 3, ya que tuvieron diámetros por debajo de las anteriores cepas y respondieron a menor cantidad de tratamientos (Cuadro 4).

En las combinaciones de compuestos de pino + Limonene mostraron los compuestos que tuvieron el mayor diámetro de inhibición los cuales fueron A. Pinene + Limonene, Pinene + Limonene (actuó en mayor cantidad de cepas con diámetros pequeños menores a 20 mm) y Terpeneol + Limonene (actuó en tres cepas con diámetros grandes de más de 17 mm). Las demás combinaciones tuvieron un promedio por debajo de éstos. Las cepas más susceptibles fueron *C. jejuni* 3 respondiendo a cuatro tratamientos (Pinene + Limonene, Terpeneol + Limonene, A. Pinene + Limonene y Carene + Limonene) y *C. jejuni* L8 respondiendo a tres tratamientos (Pinene + Limonene, A. Pinene + Limonene y Carene + Limonene) con diámetros mayores a 15 mm las cepas con mayor resistencia a las combinaciones fueron *C. coli*, *C. coli* 8, *C. coli* 10 y *C. jejuni* 2008, ya que tuvieron diámetros de inhibición menores a los anteriores y respondieron a menor cantidad de tratamientos.

Cuadro 3. Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de *Campylobacter* spp. utilizando combinación de compuestos cítricos.

	COMBINACIÓN DE COMPUESTOS CÍTRICOS					
	D. Aldehyde + Valencene	D. Aldehyde + Citral	D. Aldehyde + Decanal	D. Aldehyde + A. Terpineol	D. Aldehyde + Citronellal	A. Terpineol + Citronellal
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
CEPAS						
<i>C. coli</i>	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	47.67 ± 3.05 ^{Aw}	23.00 ± 1.73 ^{Bx}	21.00 ± 2.00 ^{Cx}	6.00 ± 0.00 ^{Dy}	6.00 ± 0.00 ^{By}
<i>C. coli 8</i>	13.33 ± 1.15 ^{By}	6.00 ± 0.00 ^{Cz}	37.33 ± 2.08 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Dz}	16.33 ± 2.08 ^{Bx}	6.00 ± 0.00 ^{Bz}
<i>C. coli 10</i>	18.67 ± 2.08 ^{Ay}	20.67 ± 2.08 ^{By}	6.00 ± 0.00 ^{Dz}	32.67 ± 1.15 ^{Bw}	24.67 ± 2.51 ^{Ax}	26.67 ± 1.52 ^{Ax}
<i>C. jejuni 3</i>	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	11.33 ± 1.15 ^{Cy}	6.00 ± 0.00 ^{Dy}	15.33 ± 0.57 ^{Bw}	6.00 ± 0.00 ^{By}
<i>C. jejuni L8</i>	6.00 ± 0.00 ^{Cz}	56.33 ± 5.50 ^{Aw}	26.33 ± 2.08 ^{By}	42.33 ± 2.51 ^{Ax}	14.67 ± 0.57 ^{Cy}	6.00 ± 0.00 ^{Bz}
<i>C. jejuni 2008</i>	13.33 ± 1.52 ^{By}	48.33 ± 1.52 ^{Aw}	12.67 ± 1.15 ^{Cy}	6.00 ± 0.00 ^{Dz}	14.00 ± 1.73 ^{Cx}	6.00 ± 0.00 ^{Bz}
CV (%)	9.06%		R ²		0.99	

Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna (A-D) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) y letras minúsculas diferentes en cada fila (w-z) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Diámetros iguales a 6 no se consideran inhibitorios.

* Zona de Inhibición.

Cuadro 4. Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de *Campylobacter* spp. utilizando compuestos de pino.

	COMPUESTOS DE PINO			
	Pinene Media ± DE	Terpineol Media ± DE	A. Pinene Media ± DE	Carene Media ± DE
CEPAS				
<i>C. coli</i>	12.67 ± 1.15 ^{A x}	6.00 ± 0.00 ^{C z}	27.33 ± 2.51 ^{B w}	9.67 ± 1.52 ^{C y}
<i>C. coli 8</i>	11.67 ± 1.52 ^{B x}	27.00 ± 2.00 ^{B w}	23.67 ± 1.52 ^{C w}	6.00 ± 0.00 ^{D y}
<i>C. coli 10</i>	6.00 ± 0.00 ^{C x}	25.00 ± 3.00 ^{B w}	22.67 ± 1.52 ^{C w}	6.00 ± 0.00 ^{D x}
<i>C. jejuni 3</i>	12.00 ± 2.00 ^{B w}	6.00 ± 0.00 ^{C x}	6.00 ± 0.00 ^{D x}	12.33 ± 1.52 ^{B w}
<i>C. jejuni L8</i>	12.00 ± 1.00 ^{B x}	6.00 ± 0.00 ^{C y}	37.67 ± 2.51 ^{A w}	12.67 ± 0.57 ^{A x}
<i>C. jejuni 2008</i>	13.33 ± 1.52 ^{A y}	39.33 ± 2.08 ^{A w}	27.00 ± 1.73 ^{B x}	11.67 ± 2.08 ^{B y}
CV (%)	10.06%		R ²	0.98

Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna (A-D) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) y letras minúsculas diferentes en cada fila (w-z) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Diámetros iguales a 6 no se consideran inhibitorios.

* Zona de Inhibición.

En este caso la cepa *C. jejuni* 3 resultó ser susceptible a la mayoría de tratamientos a diferencia de las demás combinaciones ya que esta ha resultado ser más resistente, pero en este caso se ve una disminución significativa con los tratamientos aplicados, esto se debe a la estructura de la bacteria, ésta puede ser más susceptible a los compuestos presentes en los aceites y presenta mayor sensibilidad exclusivamente a estos compuestos a diferencia de las demás cepas ya que ésta es resistente con los demás compuestos (Cuadro 5).

En las combinaciones de compuestos de pino se obtuvieron mayores diámetros de inhibición con las combinaciones Pinene + A. Pinene (actuó en cinco cepas con diámetros de más de 21 mm), Pinene + Carene (actuó en cuatro cepas con diámetros de menos de 20 mm.) y Carene + A. Pinene. Las cepas que respondieron efectivamente a los tratamientos fueron *C. coli* 8 (siendo sensible a todas las combinaciones) respondió mejor a cuatro tratamientos con diámetros de más de 20 mm, *C. coli* 10 respondió a cuatro tratamientos con diámetros mayores a 16 mm y *C. jejuni* 2008 (siendo sensible a todas las combinaciones) respondió a cinco tratamientos con diámetros mayores a 20 mm. Las cepas con mayor resistencia a las combinaciones fueron *C. jejuni* 3, *C. jejuni* L8 ya que tuvieron diámetros por debajo de las anteriores cepas. *C. coli* mostró resistencia a todas las combinaciones. Al igual que el caso de los compuestos cítricos, el sinergismo resultó mayor en combinación de aceites de pino entre sí, ya que todas las cepas respondieron en la mayoría de los tratamientos (Cuadro 6).

Las cepas que presentaron mayor resistencia fueron *Campylobacter jejuni* ya que estas cepas crecen a mayor temperatura, es por eso que esta cepa es más virulenta y resistente ante todo aspecto que las cepas de *Campylobacter coli* (Burt 2004). Es por eso que en general se observa una mejor respuesta positiva de las cepas *Campylobacter coli*. Los mejores componentes de aceites cítricos en esta etapa fueron A. Terpeneol, Decanal, Citral como aceites puros, en sus combinaciones fueron A. Terpeneol + Limonene, Citronellal + Limonene, y el Limonene por sí solo, también las combinaciones de los componentes entre ellos los mejores resultados fueron de D. Aldehyde + Citrall, D. Aldehyde + Decanal y D. Aldehyde + A. Terpeneol.

En el caso de los pinos también resultaron mejor las cepas de *Campylobacter coli* siendo los mejores compuestos A. Pinene, Pinene, y Terpeneol, sus mejores combinaciones fueron A. Pinene, + Limonene, Pinene + Limonene, Terpeneol + Limonene, Pinene + A. Pinene, Pinene + Carene, y Carene + A. Pinene. Los mejores resultados fueron con las combinaciones de los compuestos cítricos entre sí al igual que los aceites de pino y sus combinaciones con Limonene, estos tienen un sinergismo mayor en su combinación, ya que la mayoría de las cepas fue susceptible a los tratamientos.

D-aldehyde no fue efectivo en presencia del Limonene ya que no tienen similitud a nivel de ordenamiento químico, si hay diferencia significativa entre sus compuestos, éstos no presentan inhibición mayor en contra del *Campylobacter* ya que al no ser similares no pueden unificar su mecanismo de acción. Lo mismo aplica para todos los compuestos que solos presentaron inhibición y en combinación no lo hubo. Según Burt (2004) es un efecto de antagonismo a nivel químico y en su ordenamiento molecular, a mayor similitud, mayor sinergismo antimicrobiano. La separación de medias Duncan, indicó que existe diferencia entre los aceites en cada tratamiento por lo cual los aceites afectan los

tratamientos (el crecimiento de las cepas), hay cepas que presentan mayor susceptibilidad que otras y es por esto que unos aceites actúan mejor en unas cepas que en otras dependiendo de la estructura de los aceites y de la bacteria.

Cuadro 5. Diámetros de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de *Campylobacter* spp. utilizando compuestos de pino + Limonene (L).

	COMPUESTOS DE PINO + LIMONENE			
	Pinene + L Media ± DE	Terpineol + L Media ± DE	A. Pinene + L Media ± DE	Carene + L Media ± DE
CEPAS				
<i>C. coli</i>	14.00 ± 1.73 ^{Bx}	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	19.33 ± 1.52 ^{Cw}	12.00 ± 2.00 ^{Bx}
<i>C. coli 8</i>	10.00 ± 2.00 ^{Cx}	20.00 ± 1.00 ^{Aw}	21.67 ± 1.52 ^{Cw}	6.00 ± 0.00 ^{Cy}
<i>C. coli 10</i>	6.00 ± 0.00 ^{Dx}	19.67 ± 1.52 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Dx}	6.00 ± 0.00 ^{Cx}
<i>C. jejuni 3</i>	15.67 ± 2.08 ^{Bx}	17.67 ± 2.08 ^{Bx}	30.67 ± 1.15 ^{Aw}	16.67 ± 2.08 ^{Ax}
<i>C. jejuni L8</i>	20.00 ± 2.00 ^{Ax}	6.00 ± 0.00 ^{Cz}	35.67 ± 3.78 ^{Aw}	15.00 ± 2.64 ^{Ay}
<i>C. jejuni 2008</i>	13.67 ± 2.51 ^{Cx}	6.00 ± 0.00 ^{Cy}	25.00 ± 2.00 ^{Bw}	12.00 ± 2.00 ^{Bx}
CV (%)	12.75%		R ²	0.97

Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna (A-D) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) y letras minúsculas diferentes en cada fila (w-z) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Diámetros iguales a 6 no se consideran inhibitorios.

* Zona de Inhibición.

Cuadro 6. Diámetro de inhibición en milímetros (ZI)* contra crecimiento de seis cepas de *Campylobacter* spp. utilizando combinación de compuestos de pino.

CEPAS	COMBINACIÓN DE COMPUESTOS DE PINO					
	Pinene + Terpeneol	A. Pinene + Terpeneol	Carene + Terpeneol	Pinene + A. Pinene	Pinene + Carene	Carene + A. Pinene
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
<i>C. coli</i>	6.00 ± 0.00 ^{Dw}	6.00 ± 0.00 ^{Dw}	6.00 ± 0.00 ^{Dw}	6.00 ± 0.00 ^{Cw}	6.00 ± 0.00 ^{Dw}	6.00 ± 0.00 ^D
<i>C. coli 8</i>	23.33 ± 1.52 ^{Bx}	27.67 ± 2.51 ^{Bw}	24.33 ± 4.04 ^{Bx}	22.67 ± 1.15 ^{Bx}	8.33 ± 1.52 ^{Dz}	18.33 ± 1.52 ^C
<i>C. coli 10</i>	20.33 ± 2.51 ^{Cx}	12.67 ± 2.51 ^{Cy}	16.33 ± 1.52 ^{Cy}	37.00 ± 2.64 ^{Aw}	6.00 ± 0.00 ^{Dz}	6.00 ± 0.00 ^D
<i>C. jejuni 3</i>	6.00 ± 0.00 ^{Dz}	6.00 ± 0.00 ^{Dz}	6.00 ± 0.00 ^{Dz}	22.67 ± 2.08 ^{Bx}	14.33 ± 4.04 ^{By}	28.33 ± 3.51 ^B
<i>C. jejuni L8</i>	6.00 ± 0.00 ^{Dy}	6.00 ± 0.00 ^{Dy}	6.00 ± 0.00 ^{Dy}	32.33 ± 2.51 ^{Aw}	19.33 ± 2.08 ^{Ax}	36.33 ± 1.52 ^A
<i>C. jejuni 2008</i>	42.00 ± 3.60 ^{Ax}	47.67 ± 2.51 ^{Aw}	40.33 ± 2.51 ^{Ax}	21.67 ± 3.05 ^{By}	10.00 ± 2.00 ^{Cz}	21.67 ± 2.08 ^C
CV (%)	9.06%		R ²	0.99		

Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna (A-D) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) y letras minúsculas diferentes en cada fila (w-z) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Diámetros iguales a 6 no se consideran inhibitorios.

* Zona de Inhibición.

Sección 2. Ensayo de concentración inhibitoria de crecimiento. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento contra seis cepas de *Campylobacter* utilizando compuestos de aceites cítricos a tres diferentes temperaturas.

El terpeno, carvacrol, p - cimeno y timol son probablemente responsables de la actividad antimicrobiana en un grupo de terpenos (borneol , camphore , 1.8 cineol , α -pineno, camphone, verbenonone y bornilo acetato) (Davidson y Naidu 2000). Estos compuestos son responsables de la actividad antimicrobiana en la disminución del crecimiento de las diferentes cepas de *Campylobacter* y fueron utilizados algunos de ellos a lo largo de este estudio. En la Figura 1 se observa el comportamiento del efecto antimicrobiano del compuesto cítrico A. Terpeneol para la cepa *Campylobacter coli* a las tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C) y a los dos tiempos (0 y 24 horas) en la medición de densidad óptica a 600 nm. Indicando que el mejor tratamiento fue a las 24 horas a 23 °C, ya que se muestra la mayor disminución del crecimiento del microorganismo.

En la Figura 2 se indican los compuestos cítricos D. Aldehyde, Citral, Decanal y A. Terpeneol para la cepa *Campylobacter coli* 8. Los mejores tratamientos fueron los compuestos Citral y A. Terpeneol a las 24 horas a 4 °C. Antes de la exposición a condiciones desfavorables, el estrés del microorganismo puede cambiar, la susceptibilidad de las células cambia ante los antimicrobianos naturales es por eso que estas se ven afectadas (Gill *et al.* 2002).

Friedman *et al.* (2002) evaluaron 96 aceites vegetales de origen natural y diferentes compuestos de petróleo contra *C. jejuni* en suplementación con agar hierro brucella. Los aceites de raíz de jengibre, jazmín, pachulí, gardenia y bergamota fueron más efectivos con actividad bactericida y se logró una reducción del 50%. Compuestos del aceite de bergamota como los terpenos que fueron utilizados en este estudio. En la Figura 3 el comportamiento del efecto antimicrobiano del compuesto cítrico A. Terpeneol para la cepa *Campylobacter coli* 10 indicó que el mejor tratamiento fue a las 24 horas a 37 °C, ya que se muestra la mayor disminución del crecimiento del microorganismo con una disminución de densidad óptica. En el caso de la Figura 4 el comportamiento del efecto antimicrobiano del compuesto cítrico Decanal para la cepa *Campylobacter jejuni* 3 mostró que el mejor tratamiento fue a las 24 horas a 4 °C, ya que se muestra una disminución de densidad óptica.

En la Figura 5 los compuestos cítricos Valencene, Decanal y A. Terpeneol indican que para la cepa *Campylobacter jejuni* L8 el mejor tratamiento fue A. Terpeneol a las 24 horas a 37 °C y a 23 °C siendo el mejor de todos y el más eficiente a la última temperatura, el compuesto Decanal tuvo efecto significativo a las 24 horas a 23 °C, y finalmente el aceite Valencene tuvo su mejor efecto a 37 °C a las 24 horas. En la Figura 6 se observa el efecto antimicrobiano de los compuestos cítricos Citral, Decanal y A. Terpeneol para la cepa *Campylobacter jejuni* 2008, en este caso los compuestos A. Terpeneol a las 24 horas a 37 °C siendo el mejor y el más eficiente, el compuesto Decanal tuvo efecto significativo a las 24 horas a 23 °C, y finalmente el compuesto Citral tuvo su mejor efecto a 23 y 37 °C a las 24 horas siendo mejor a la última temperatura.

Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento contra seis cepas de *Campylobacter* utilizando compuestos cítricos a tres diferentes temperaturas.

Se determinaron las mejores combinaciones para cada una de las cepas basándose en los mayores diámetros de inhibición que se obtuvo por cada una, estas se midieron a tres diferentes temperaturas (4 °C, 23 °C, 37 °C) y a dos tiempos diferentes (0 y 24 horas).

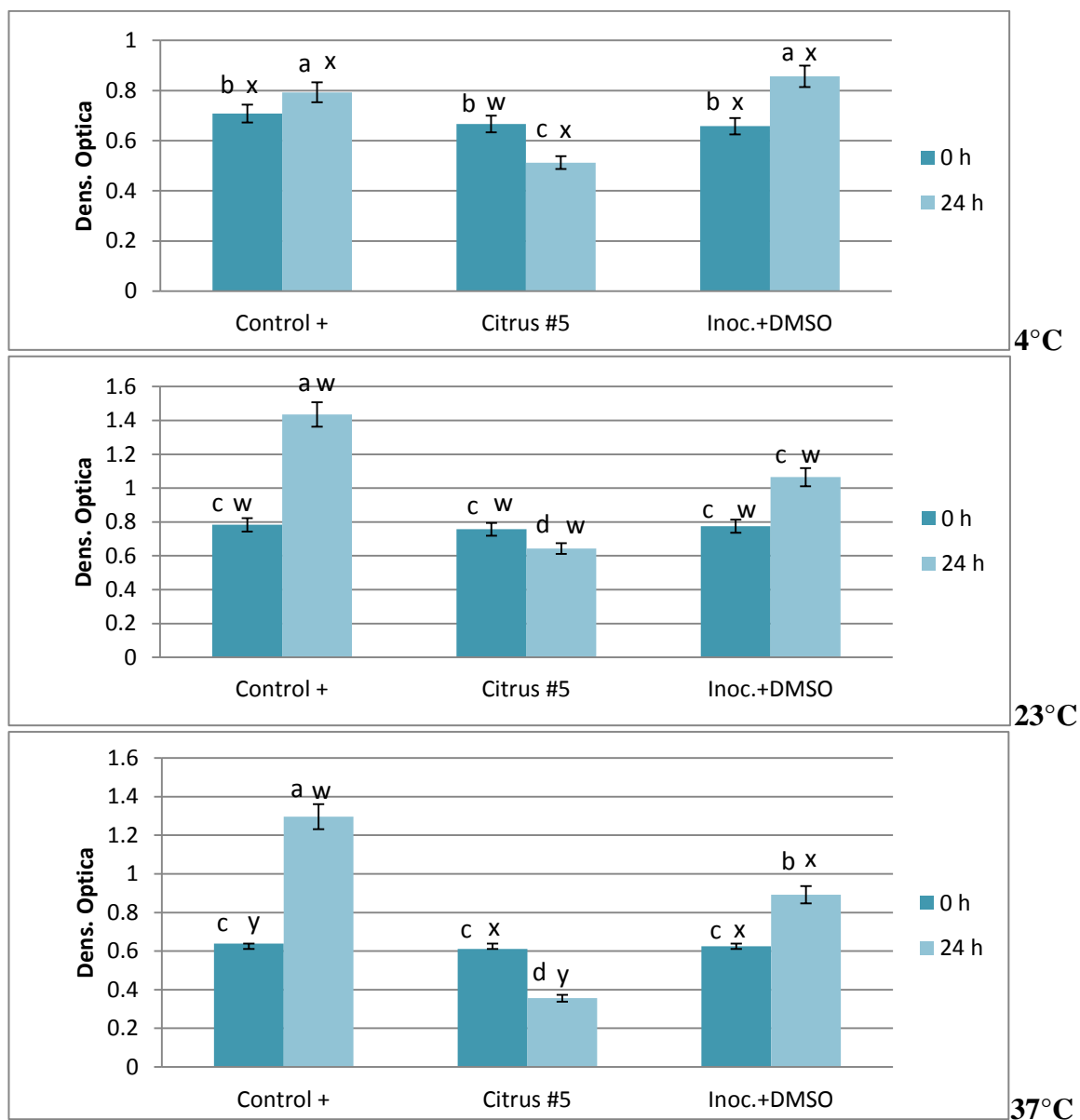


Figura 1. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* utilizando compuestos cítricos a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #5: A. Terpineol

Inóculo + DMSO: Cepa + Dimetilsulfuróxido (Disolvente orgánico)

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

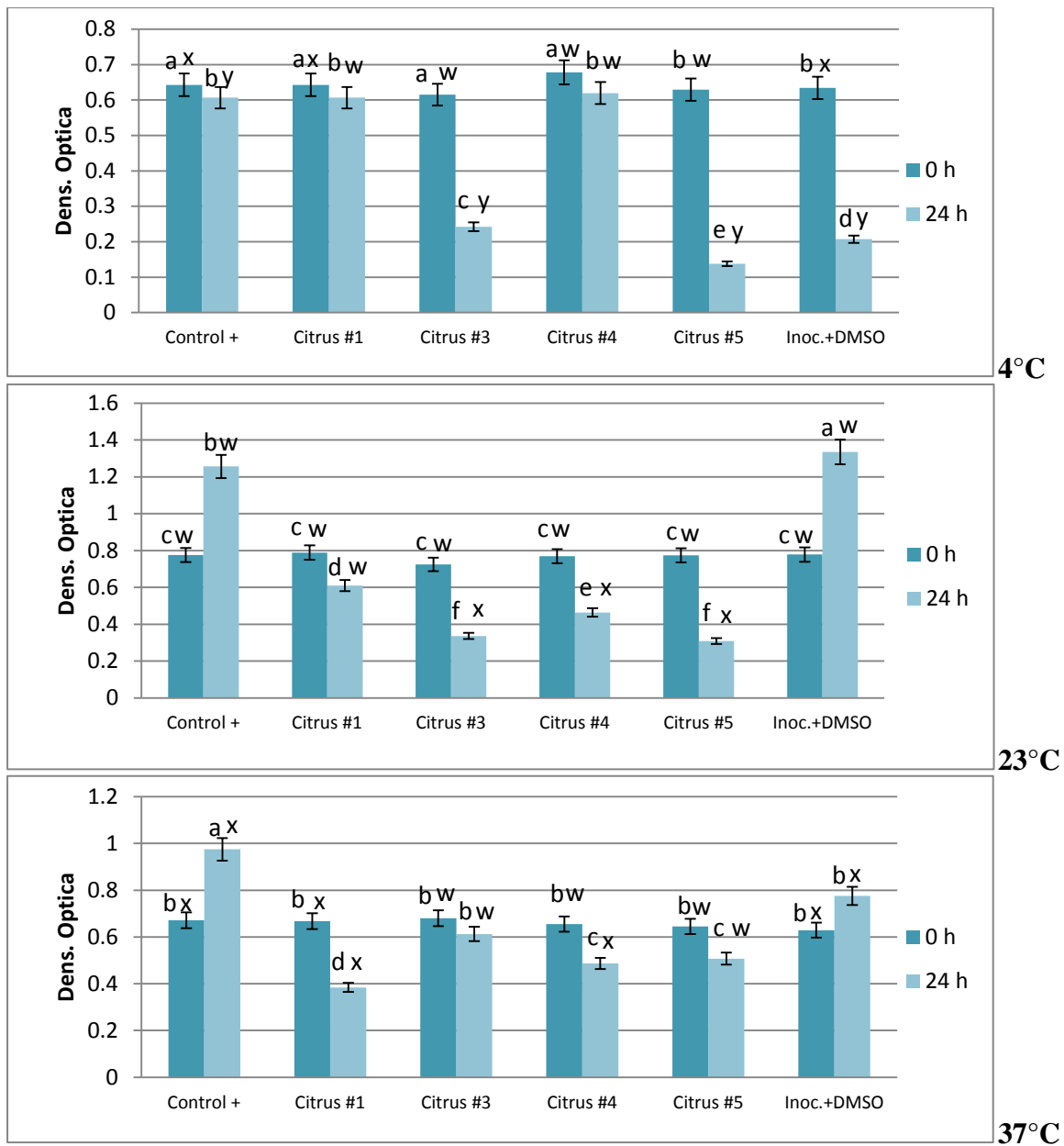


Figura 2. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* 8 utilizando compuestos cítricos a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #1: D. Aldehído

Cítrico #3: Citral

Cítrico #4: Decanal

Cítrico #5: A. Terpineol

Inóculo + DMSO: Cepa + Dimetilsulfuróxido (Disolvente orgánico)

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

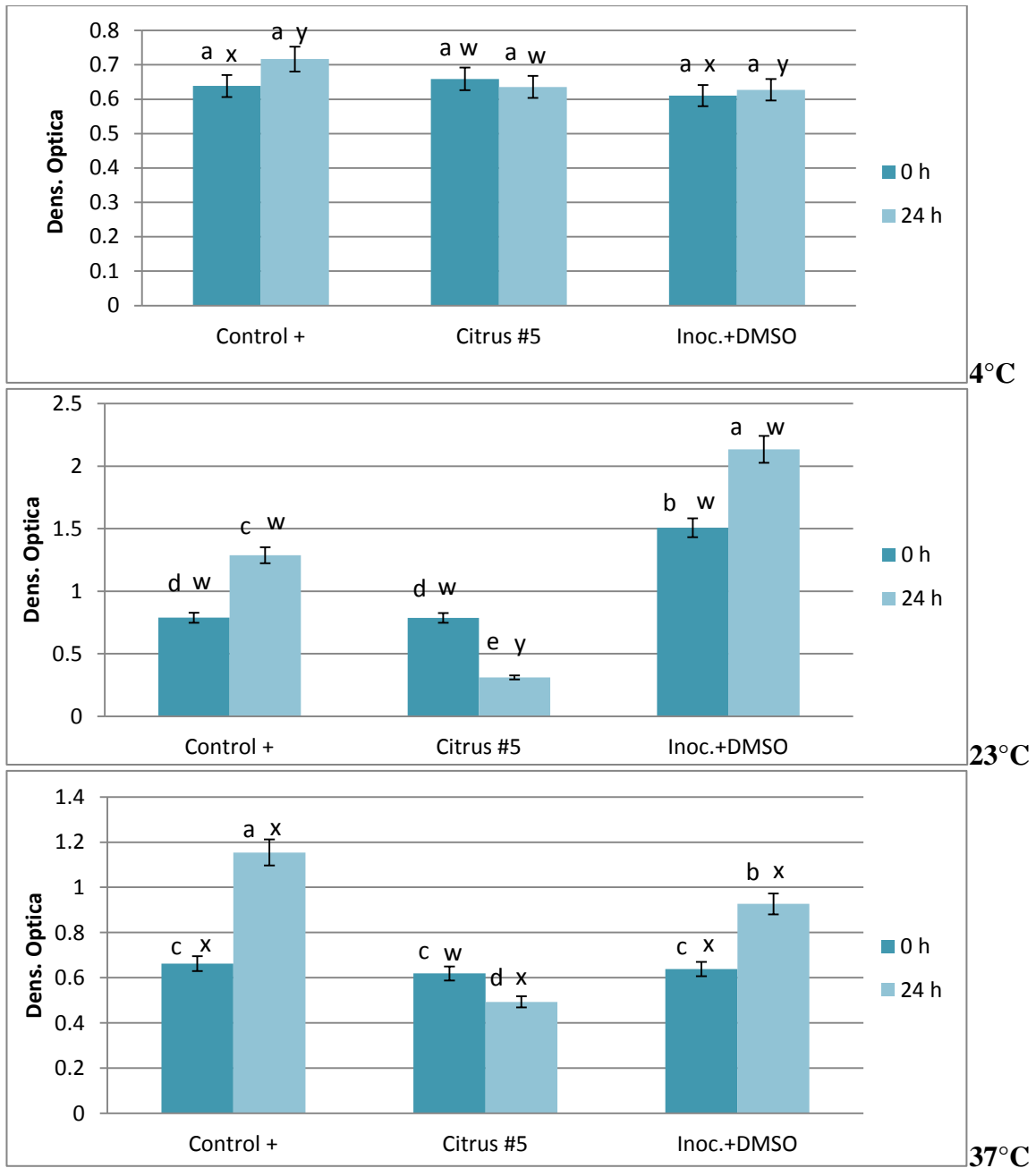


Figura 3. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* 10 utilizando compuestos cítricos a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #5: A. Terpineol

Inóculo + DMSO: Cepa + Dimetilsulfuróxido (Disolvente orgánico)

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

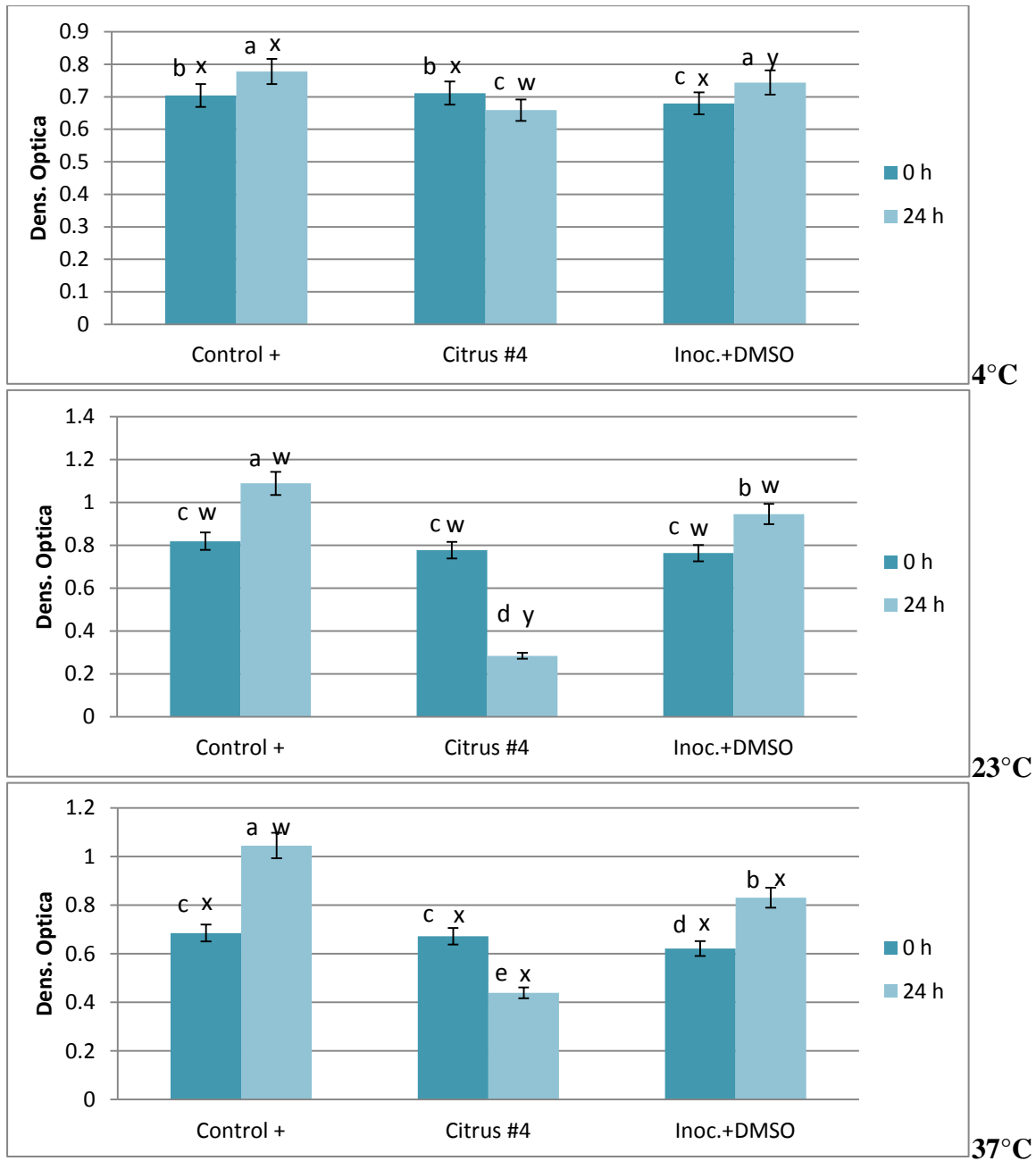


Figura 4. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* 3 utilizando compuestos cítricos a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #4: Decanal

Inóculo + DMSO: Cepa + Dimetilsulfuróxido (Disolvente orgánico)

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

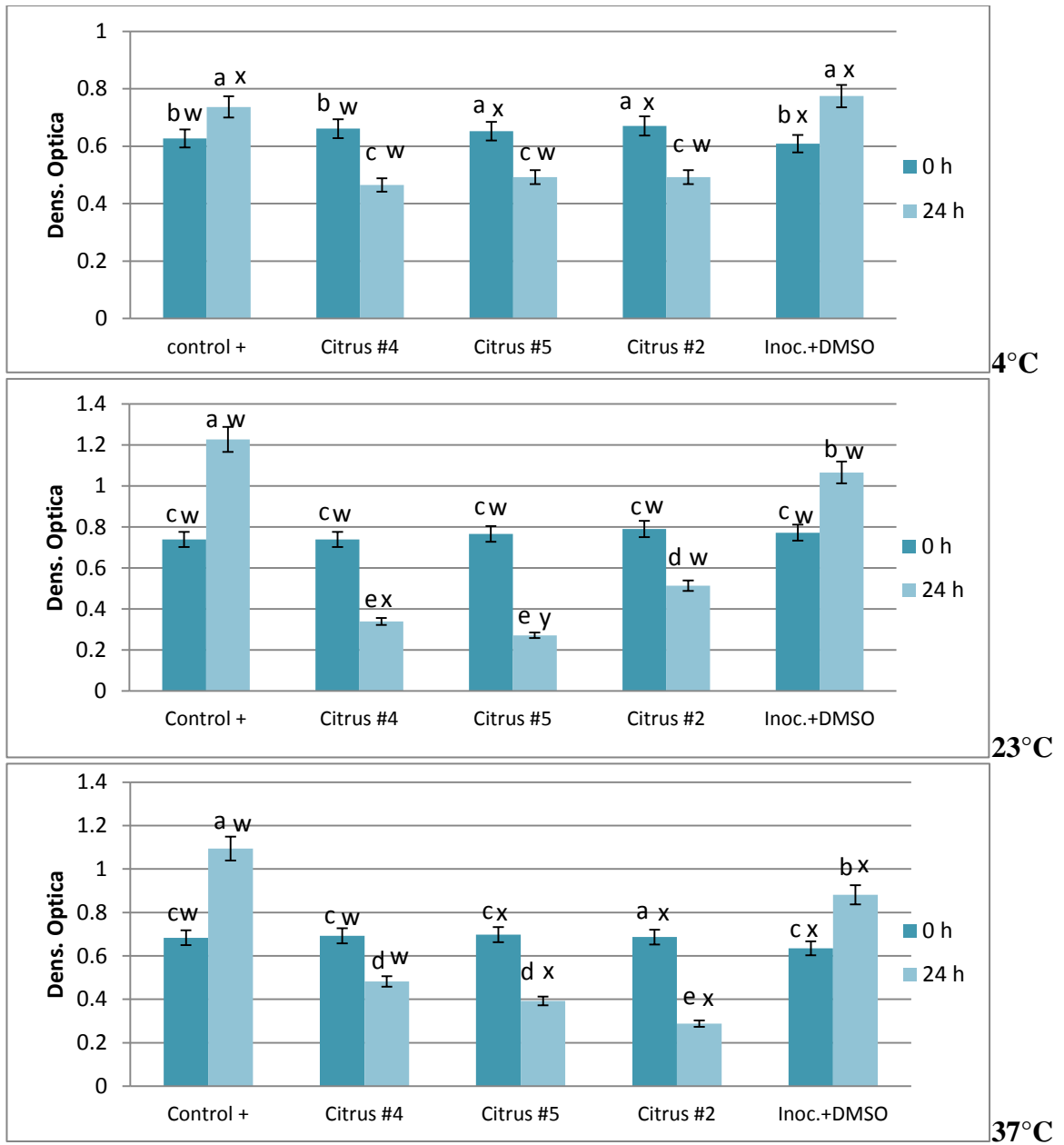


Figura 5. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* L8 utilizando compuestos cítricos a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #2: Valencene

Cítrico #4: Decanal

Cítrico #5: A. Terpineol

Inóculo + DMSO: Cepa + Dimetilsulfuróxido (Disolvente orgánico)

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

El compuesto A. Terpineol tuvo mejor inhibición en la mayoría de las cepas a las cuales fue aplicado (*C.coli*, *C. coli* 8, *C. coli* 10, *C. jejuni* L8 y *C. jejuni* 2008). Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento contra seis cepas de *Campylobacter* utilizando compuestos de aceites cítricos + Limonene a tres diferentes temperaturas. La Figura 7 indica el comportamiento del efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos cítricos + Limonene para la cepa *Campylobacter coli* a las tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C) y a los dos tiempos (0 y 24 horas) en la medición de densidad óptica a 600 nm. Indicando que los mejores tratamientos fueron las combinaciones de los compuestos Citronellal + Limonene a las 24 horas a 37 y 23 °C siendo la última temperatura la más eficiente, el Limonene por sí solo tuvo efecto significativo a las 24 horas a 37 y 23 °C siendo la última la más eficiente. La combinación D. Aldehyde + A. Terpineol a 23 °C no tuvo efecto inhibitorio significativo ya que el microorganismo creció normalmente después de 24 horas. Las demás temperaturas y tiempos tuvieron efecto positivo pero promedios menores de disminución del microorganismo.

Se utilizaron compuestos fenólicos ya que en todos los aceites hay presencia de dichos compuestos. La capacidad de los fenoles puede interferir con el metabolismo celular a través de un número de mecanismos como disrupción de la membrana y la inactivación de enzimas (Cowan 1999). También su capacidad de penetrar en la membrana son factores importantes que inciden en la sensibilidad o resistencia de las células (Helander *et al.* 1998, Griffin *et al.* 1999, Cox *et al.* 2000, Lambert *et al.* 2001). De estos factores depende la resistencia o susceptibilidad de las cepas de *Campylobacter* utilizadas en este estudio, uno de los factores antes mencionados se ven directamente relacionados con la inhibición del crecimiento del microorganismo.

En la Figura 8 la combinación de compuestos cítricos + Limonene para la cepa *Campylobacter coli* 8 obtuvo los mejores tratamientos los cuales fueron las combinaciones de Citronellal + Limonene a las 24 horas a 37 y 23 °C, el Limonene por sí solo, tuvo efecto significativo a las 24 horas a 37 y 23 °C, en dichos tratamientos se muestra la mayor disminución del crecimiento del microorganismo con una disminución de Densidad óptica. La combinación D. Aldehyde + A. Terpineol a 23 °C no tuvo efecto inhibitorio significativo ya que el microorganismo no disminuyó su crecimiento después de 24 horas. En la Figura 9 se indica el comportamiento del efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos cítricos + Limonene para la cepa *Campylobacter coli* 10, indicando que los mejores tratamientos fueron las combinaciones de los aceites A. Terpineol + Limonene a las 24 horas a 4 y 37 °C siendo mejor la última temperatura, el Limonene por sí solo, tuvo efecto significativo a las 24 horas a 4 °C y 37 °C siendo mejor la última temperatura y la combinación de A. Terpineol + Citronellal a 37 °C a las 24 horas se observó una disminución en dichos tratamientos.

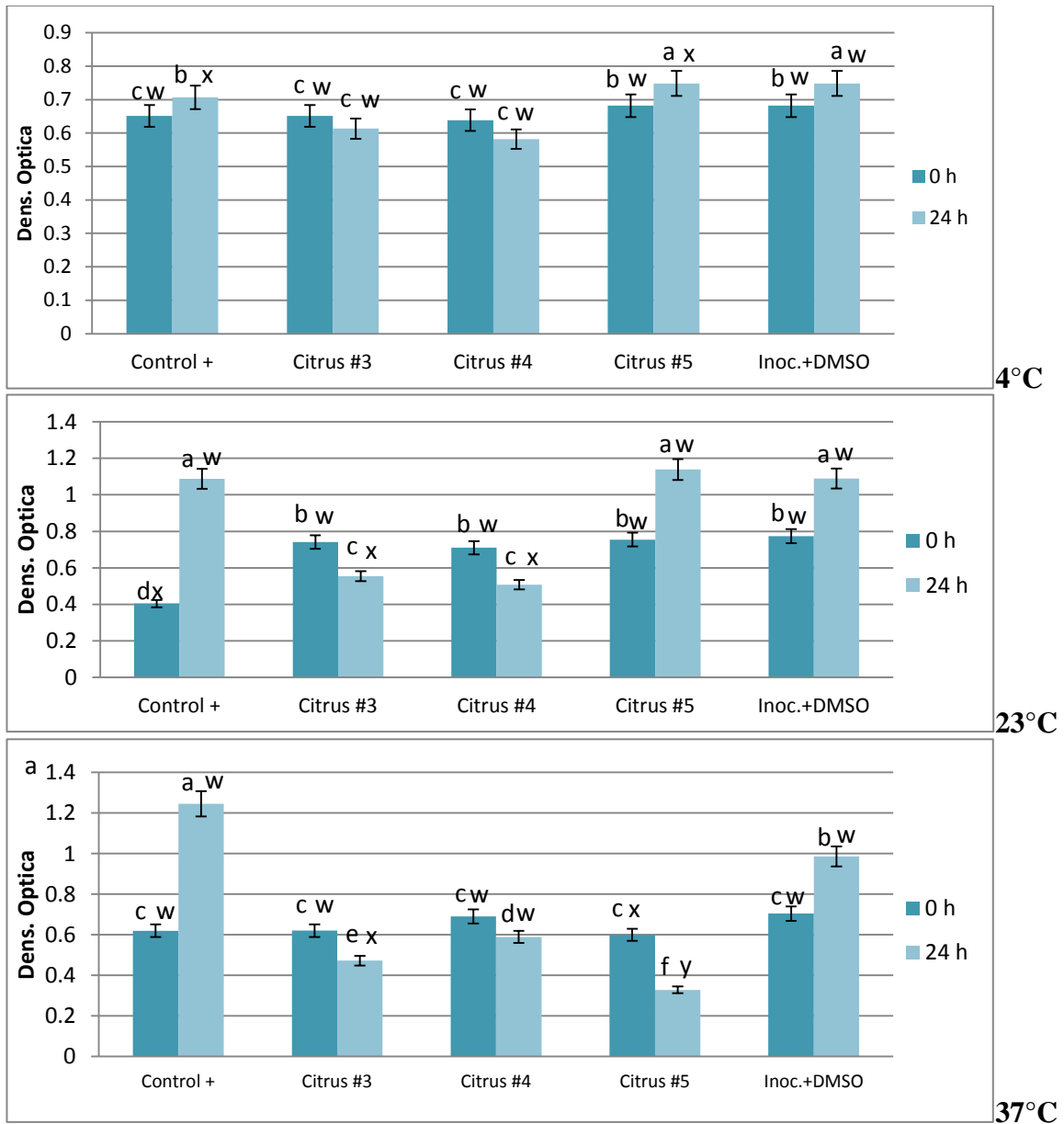


Figura 6. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* 2008 utilizando compuestos cítricos a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #3: Citral

Cítrico #4: Decanal

Cítrico #5: A. Terpineol

Inóculo + DMSO: Cepa + Dimetilsulfuróxido (Disolvente orgánico)

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento contra seis cepas de *Campylobacter* utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres diferentes temperaturas.

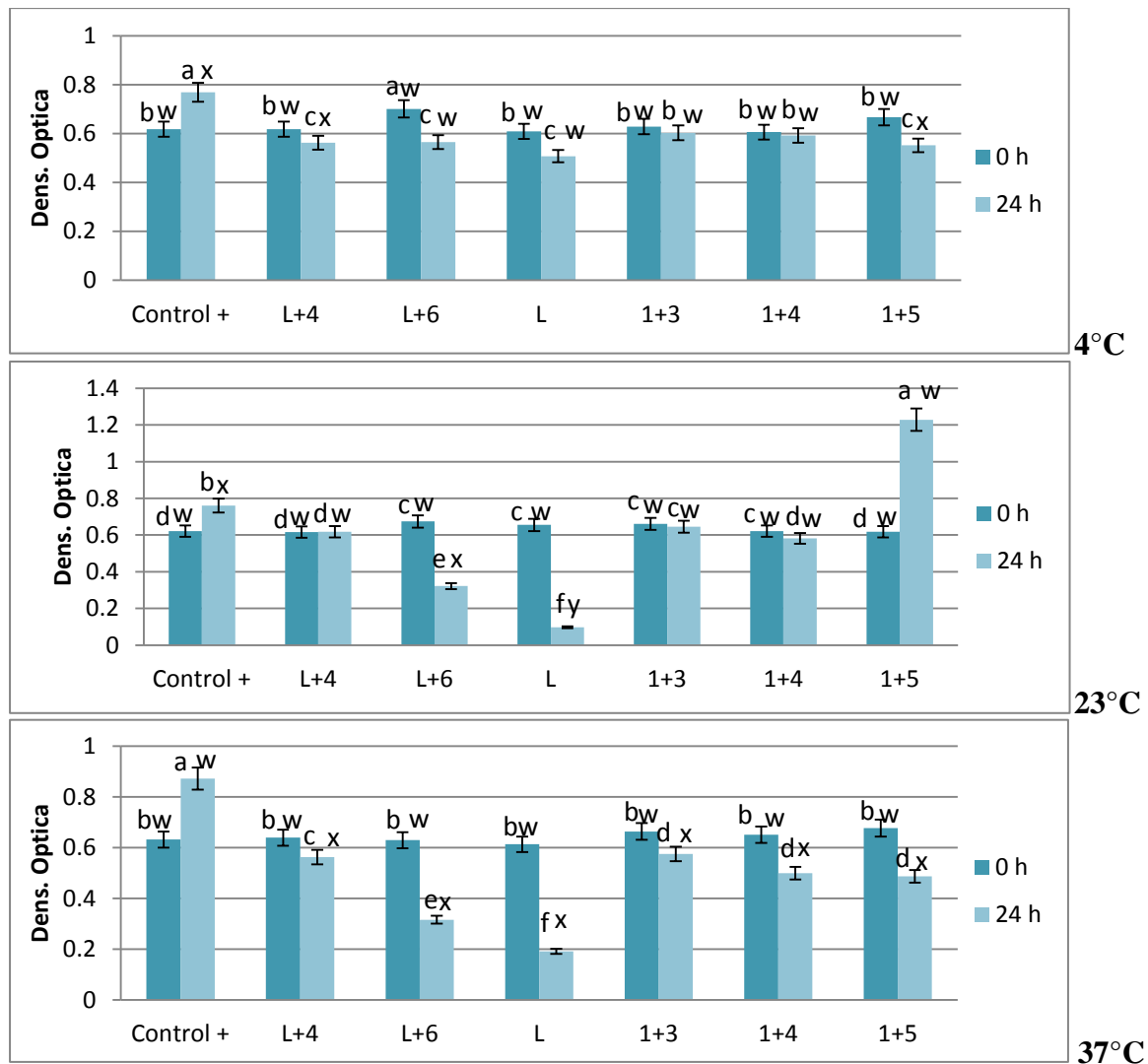


Figura 7. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #1: D. Aldehyde

Cítrico #3: Citral

Cítrico #4: Decanal

Cítrico #5: A. Terpeneol

Cítrico #6: Citronellal

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

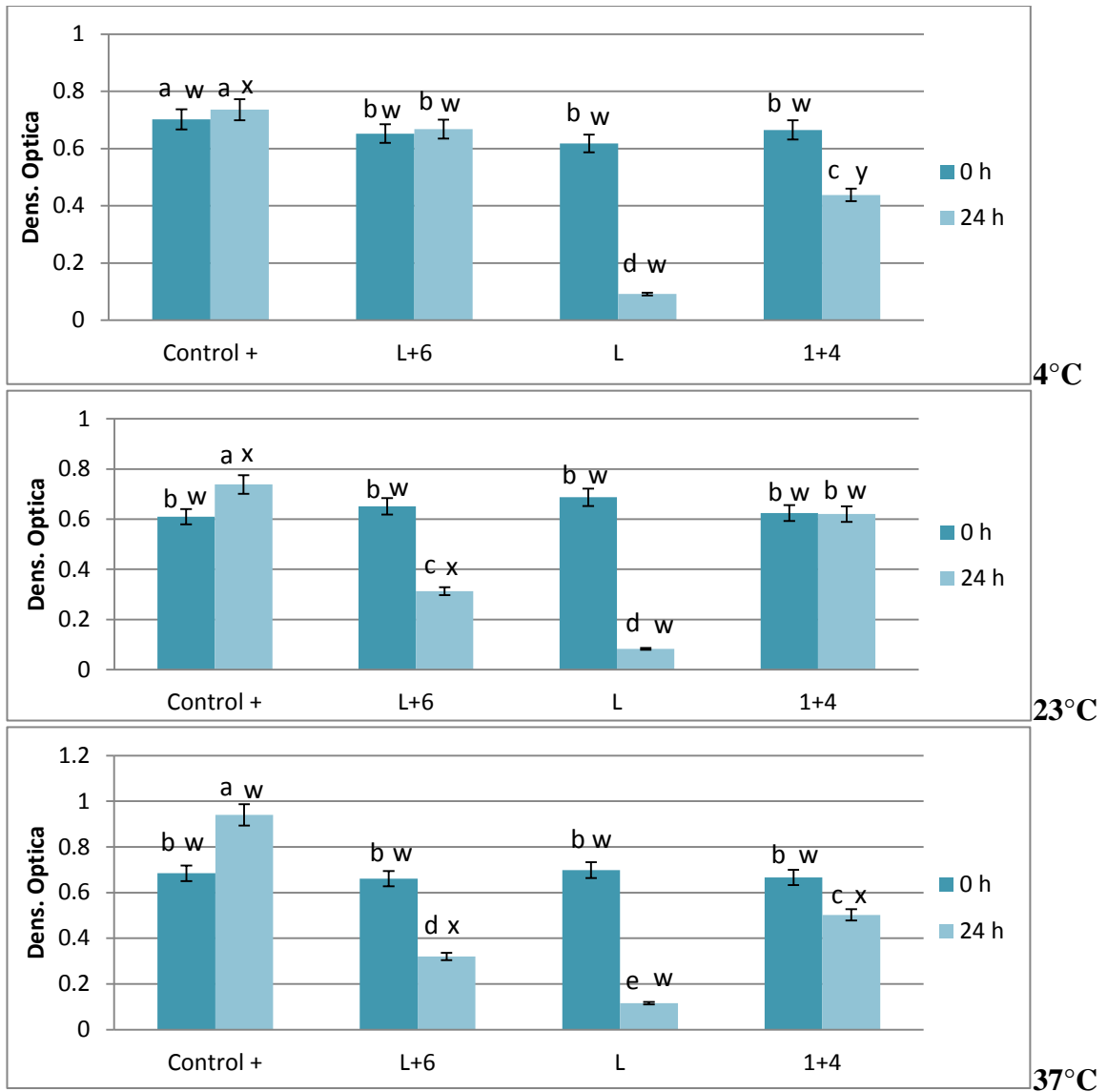


Figura 8. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* 8 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #1: D. Aldehyde

Cítrico #4: Decanal

Cítrico #6: Citronellal

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

Hay pruebas abrumadoras de que muchos de estos antimicrobianos de aceites esenciales actúan en la membrana citoplasmática, alterando su función y estructura, en algunos casos, causando la hinchazón y el aumento de su permeabilidad. Una constante observación es un aumento en K^+ y, a menudo flujo de salida del contenido citoplasmático de las células en respuesta a los antimicrobianos (Griffin *et al.* 1999). Estos efectos pueden desarrollarse como resultado de despolarización de la membrana por transporte de iones alterados o a través de cambios en la estructura de la membrana, la inhibición de generación de energía (ATP) por la interferencia con la absorción de glucosa o inhibición de enzimas implicados en nivel oxidativo o de fosforilación de sustrato. Los aumentos en la permeabilidad de la membrana citoplasmática parecen ser una consecuencia de la pérdida del gradiente de pH celular, disminución de niveles de ATP y de la pérdida de fuerza motriz de protones, que conducen a la muerte celular (Cowan 1999) Esto tiene que ver con las cepas que responden de una manera positiva ante los antimicrobianos.

La Figura 10 muestra el efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos cítricos + Limonene para la cepa *Campylobacter jejuni* 3. Los mejores tratamientos fueron las combinaciones de los compuestos Citronellal + Limonene a las 24 horas a 23 °C, el Limonene por sí solo, tuvo efecto significativo a las 24 horas a 4 y 23 °C siendo el último el más eficiente, en dichos tratamientos se muestra la mayor disminución del crecimiento del microorganismo. La combinación D. Aldehyde + Citronellal a 23 °C no tuvo efecto inhibitorio significativo ya que el microorganismo no disminuyó su crecimiento a las 0 horas. La Figura 11 muestra la combinación de compuestos cítricos + Limonene para la cepa *Campylobacter jejuni* L8, los mejores tratamientos fueron las combinaciones de A. Terpineol + Limonene a las 24 horas a 23 °C, el Limonene por sí solo tuvo efecto significativo a las 24 horas a 4 y 37 °C, en dichos tratamientos se muestra la mayor disminución del crecimiento del microorganismo.

La Figura 12 muestra las combinaciones de compuestos cítricos + Limonene para la cepa *Campylobacter jejuni* 2008, se observó que los mejores tratamientos fueron las combinaciones de los compuestos Citronellal + Limonene a las 24 horas a 23 y 37 °C, el Limonene por sí solo, tuvo efecto significativo a las 24 horas a 23 °C, en dichos tratamientos se muestra la mayor disminución del crecimiento del microorganismo.

No todos los antimicrobianos de aceites esenciales actúan de la misma manera, los cambios en su concentración pueden cambiar la naturaleza de la acción inhibitoria. Estos efectos pueden ser relacionados con la influencia de la concentración de la solubilidad en la membrana del microorganismo, estas diferencias podrían estar relacionadas con la membrana citoplasmática, la solubilidad de los agentes antimicrobianos o diferencias en sistemas enzimáticos responsables de la susceptibilidad del microorganismo (Walsh *et al.* 2003). Se debe determinar si los cambios de permeabilidad en la membrana son efectos primarios o son una consecuencia de efectos directos sobre el sistema de generación de energía (ATP), de la absorción, o inhibición de reacciones enzimáticas críticas para el mantenimiento de la viabilidad celular y el metabolismo normal.

Se observa que los aceites trabajaron mejor a temperaturas de 23 y 37 °C ya que se acerca y/o está dentro del crecimiento de *Campylobacte spp.* dentro de éste rango el *Campylobacter* crece aún más, es por eso que al ser una cepa viable, los compuestos antimicrobianos actúan de mejor manera inhibiendo al mismo ya que si éste no creciera, el antimicrobiano no tendría que microorganismo inhibir.

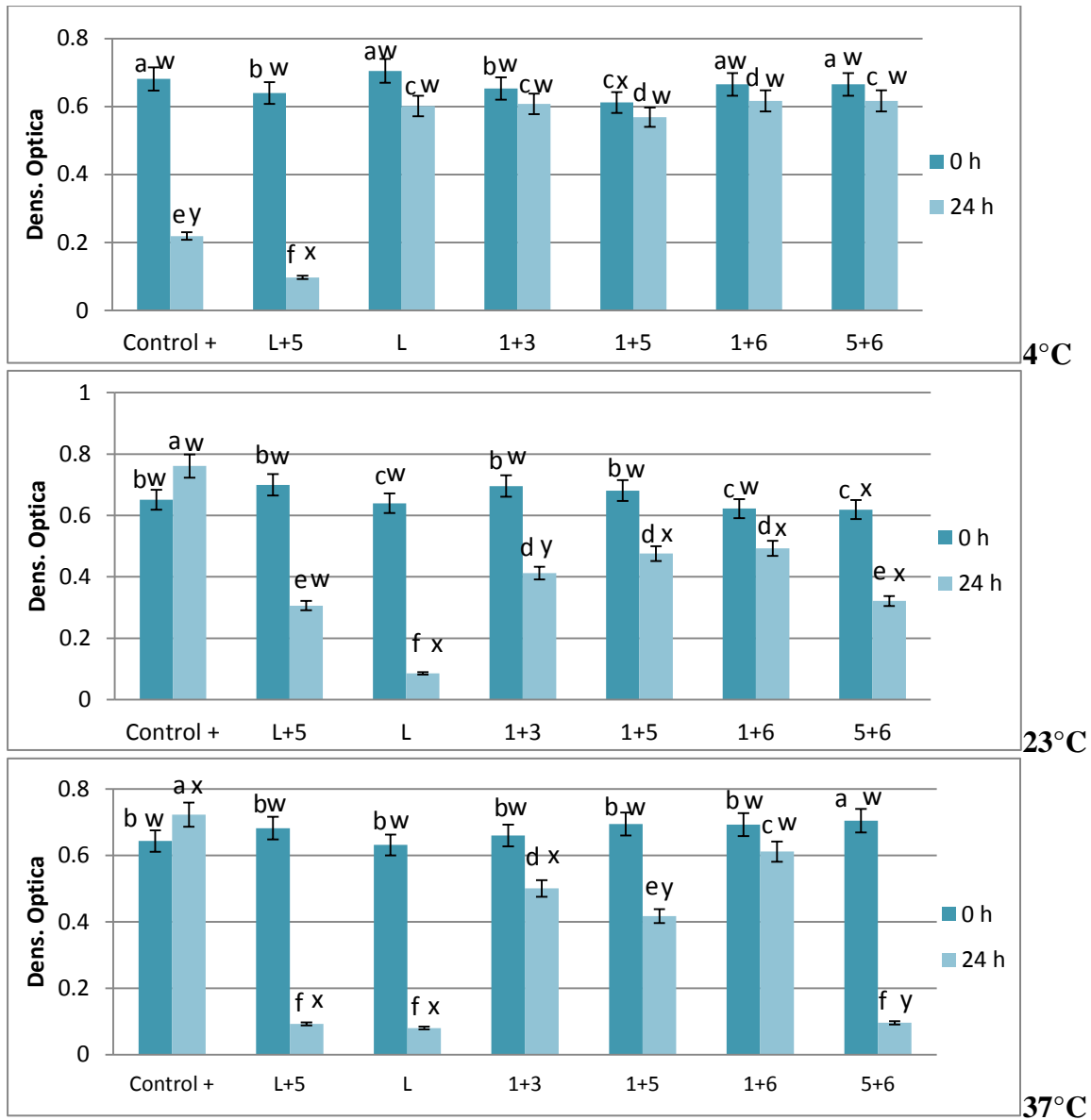


Figura 9. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* 10 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #1: D. Aldehyde

Cítrico #3: Citral

Cítrico #5: A. Terpeneol

Cítrico #6: Citronellal

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

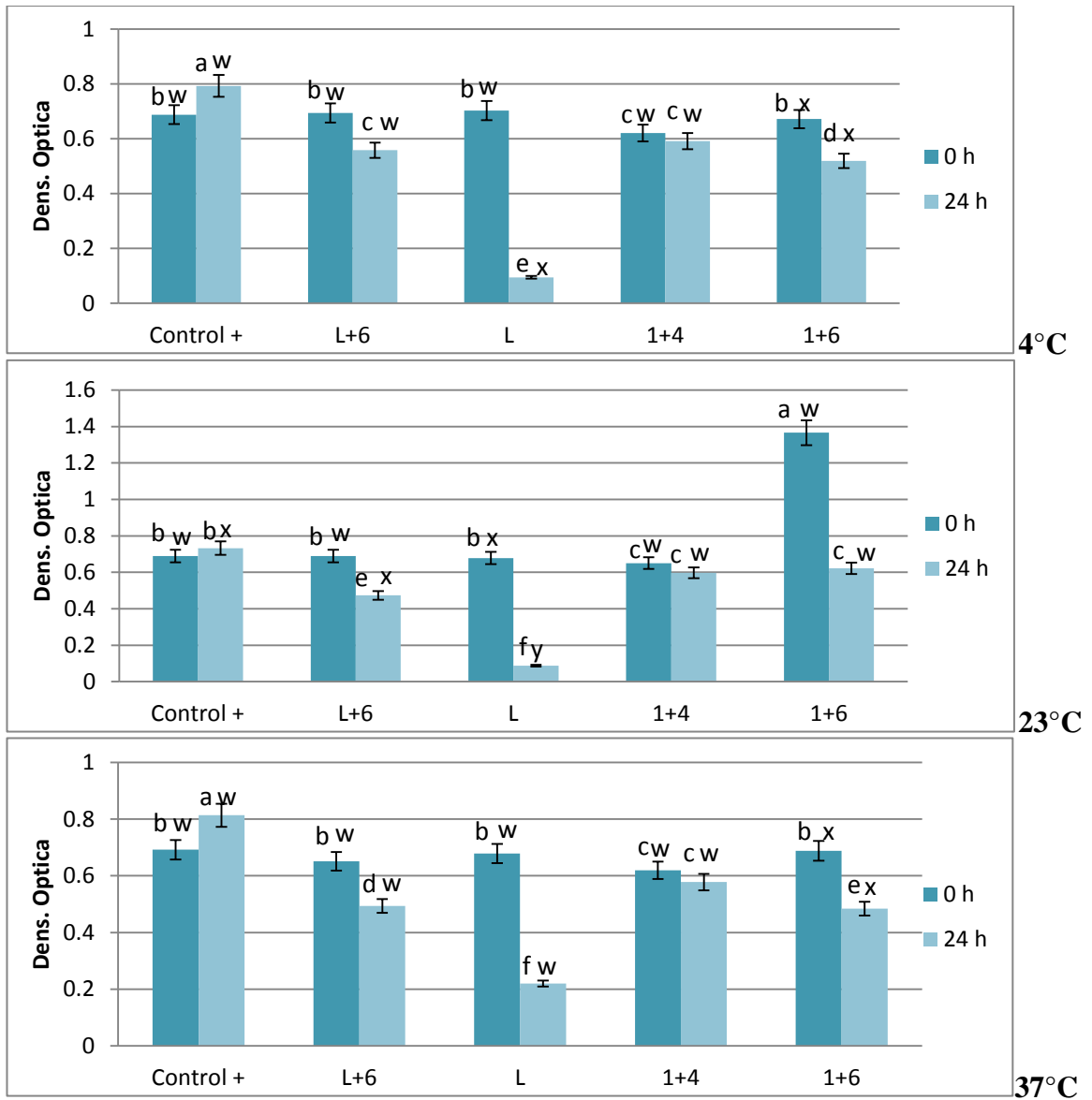


Figura 10. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* 3 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa en caldo BHI sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #1: D. Aldehyde

Cítrico #4: Decanal

Cítrico #6: Citronellal

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

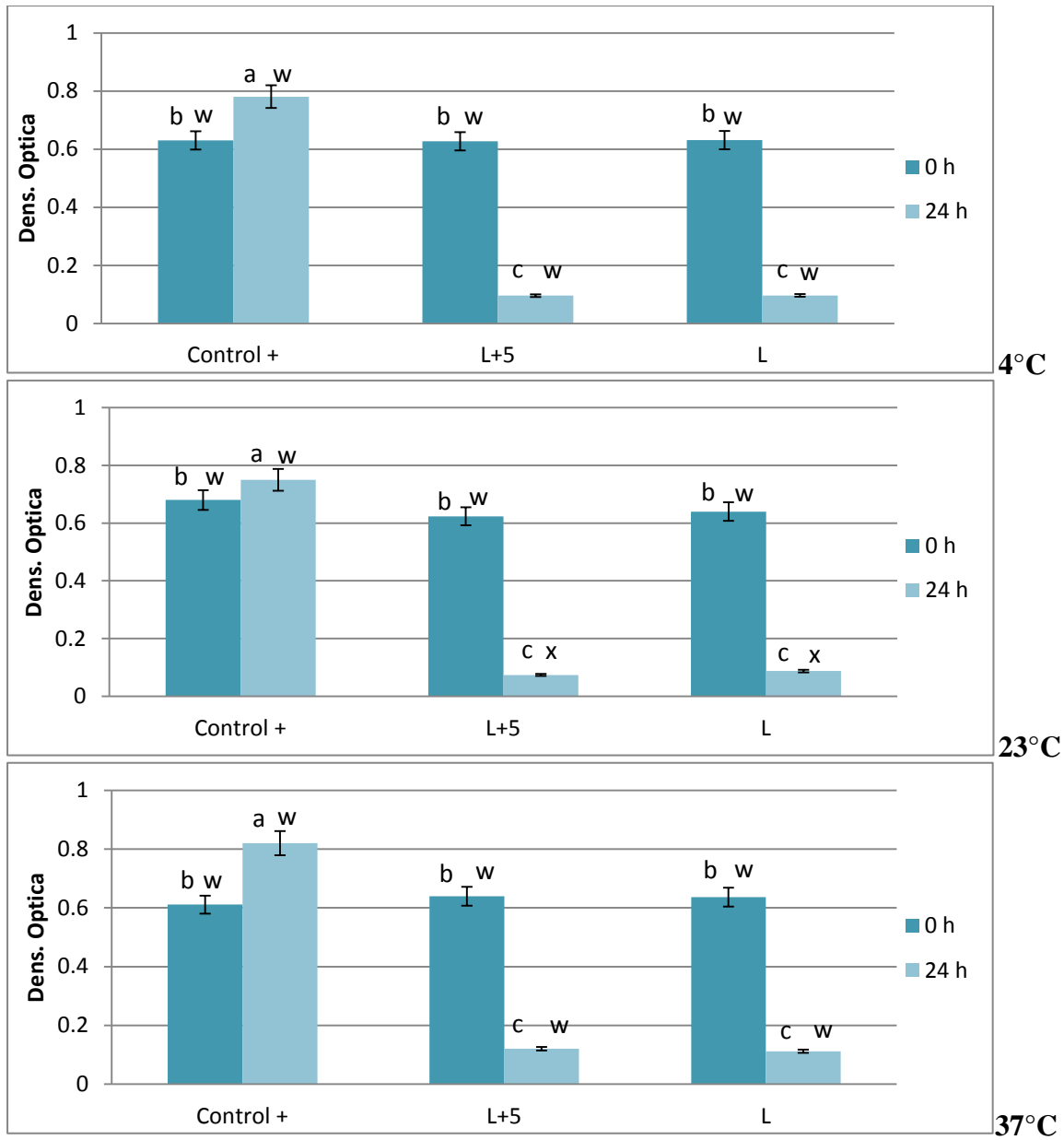


Figura 11. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* L8 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #5: A. Terpeneol

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

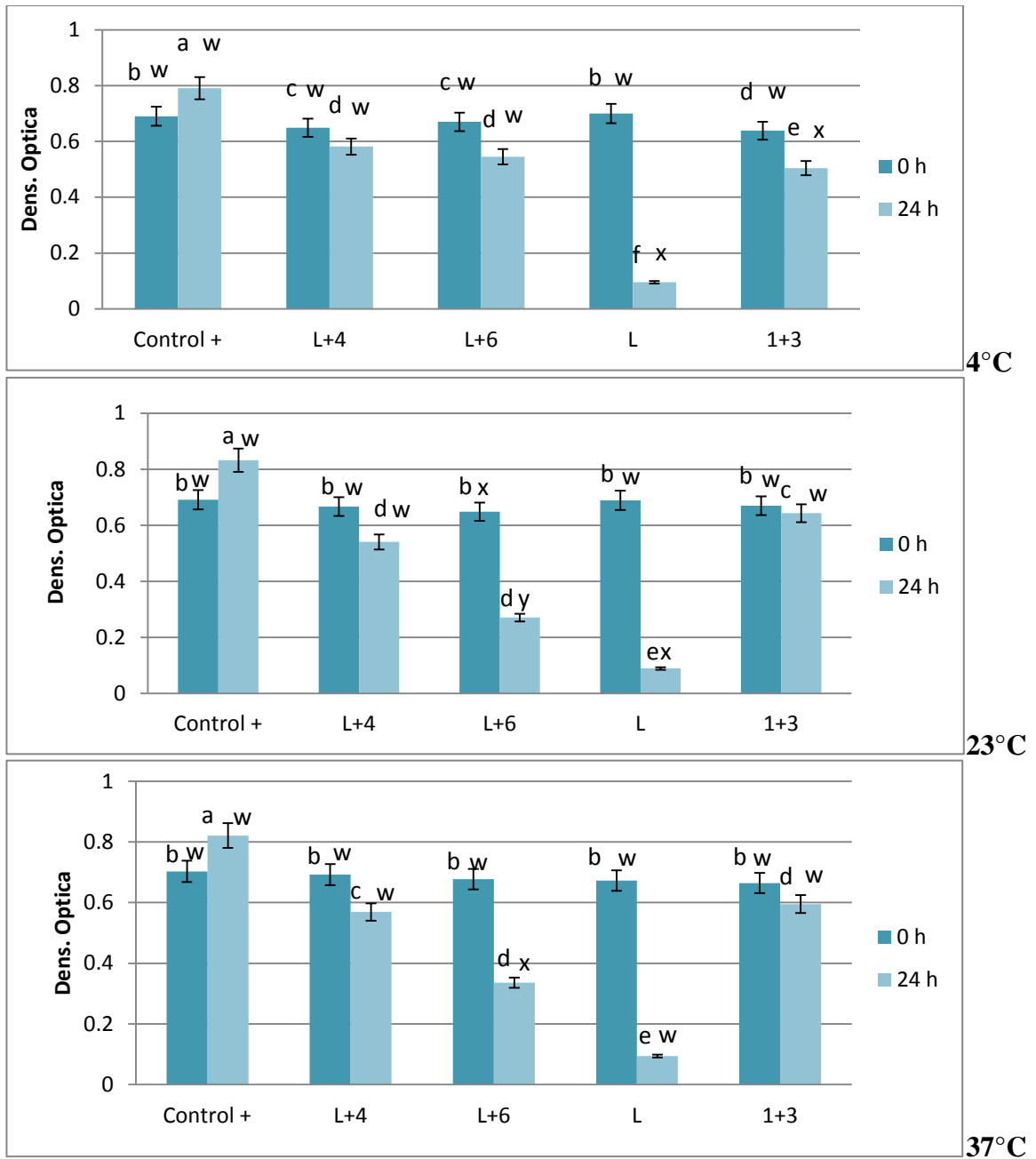


Figura 12. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* 2008 utilizando compuestos cítricos + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #1: D. Aldehyde

Cítrico #3: Citral

Cítrico #4: Decanal

Cítrico #6: Citronellal

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento contra seis cepas de *Campylobacter* utilizando compuestos de pino + Limonene a tres diferentes temperaturas. Figura 13 muestra el comportamiento del efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos de pino + Limonene para la cepa *Campylobacter coli* a las tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C) y a los dos tiempos (0 y 24 horas) en la medición de densidad óptica a 600 nm. Indicando que los mejores tratamientos fueron las combinaciones de A. Pinene + Limonene a las 24 horas a 23 y 37 °C siendo mejor la última temperatura, el compuesto A. Pinene tuvo efecto significativo a las 24 horas a 23 y 37 °C siendo mejor la última temperatura. El compuesto Pinene tuvo su mayor eficiencia a las 24 horas a 37 °C, en dichos tratamientos se muestra la mayor disminución del crecimiento del microorganismo. Las demás temperaturas y tiempos tuvieron efecto positivo pero promedios menores de disminución del microorganismo.

La Figura 14 indica el comportamiento de la combinación de compuestos de pino + Limonene para la cepa *Campylobacter coli* 8, indicando que los mejores tratamientos fueron Pinene a las 24 horas a 23 y 37 °C, Terpeneol a las 24 horas a 37 °C, A. Pinene a las 24 horas resultó efectivo a las tres temperaturas y A. Pinene + Limonene a las 24 horas a 23 y 37 °C siendo todas las combinaciones más eficientes a 37 °C. En cambio en la Figura 15 indica la combinación de compuestos de pino + Limonene para la cepa *Campylobacter coli* 10. Indicando que el mejor tratamiento fue A. Pinene a las 24 horas a 37 y 23 °C, en dichos tratamientos se muestra la mayor disminución del crecimiento del microorganismo. Las demás temperaturas y tiempos tuvieron efecto positivo pero promedios menores de disminución del microorganismo. En la Figura 16 el comportamiento del efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos de pino + Limonene para la cepa *Campylobacter jejuni* 3 fueron los compuestos A. Pinene + Limonene a las 24 horas a 23 y 37 °C, siendo mejor en la última temperatura. El compuesto Pinene mostró su mayor eficiencia a las 24 horas a 37 °C.

En la Figura 17 se muestra el efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos de pino + Limonene para la cepa *Campylobacter jejuni* L8. Los mejores tratamientos fueron el compuesto A. Pinene + Limonene a las 24 horas a 37 y 23 °C, siendo mejor en la última temperatura. A. Pinene mostró su mayor eficiencia a las 24 horas a 23 y 37 °C, siendo mejor la última temperatura. En la Figura 18 se observa el comportamiento de la combinación de compuestos de pino + Limonene para la cepa *Campylobacter jejuni* 2008. Los mejores tratamientos fueron A. Pinene + Limonene a las 24 horas a 37 y 23 °C, siendo mejor en la última temperatura, A. Pinene mostró su mayor eficiencia a las 24 horas a 23 y 37 °C, siendo mejor la última temperatura.

No se sabe con certeza si hay decrecimiento del *Campylobacter* y de un tratamiento mejor o más eficiente ya que todos los tratamientos inhibieron crecimiento con respecto al control, con la medición de Densidad Óptica no puede determinarse precisamente si las células están vivas o muertas, pero en todos los tratamientos antes mencionados se vio hubo una notoria disminución del crecimiento de las cepas de *Campylobacter*.

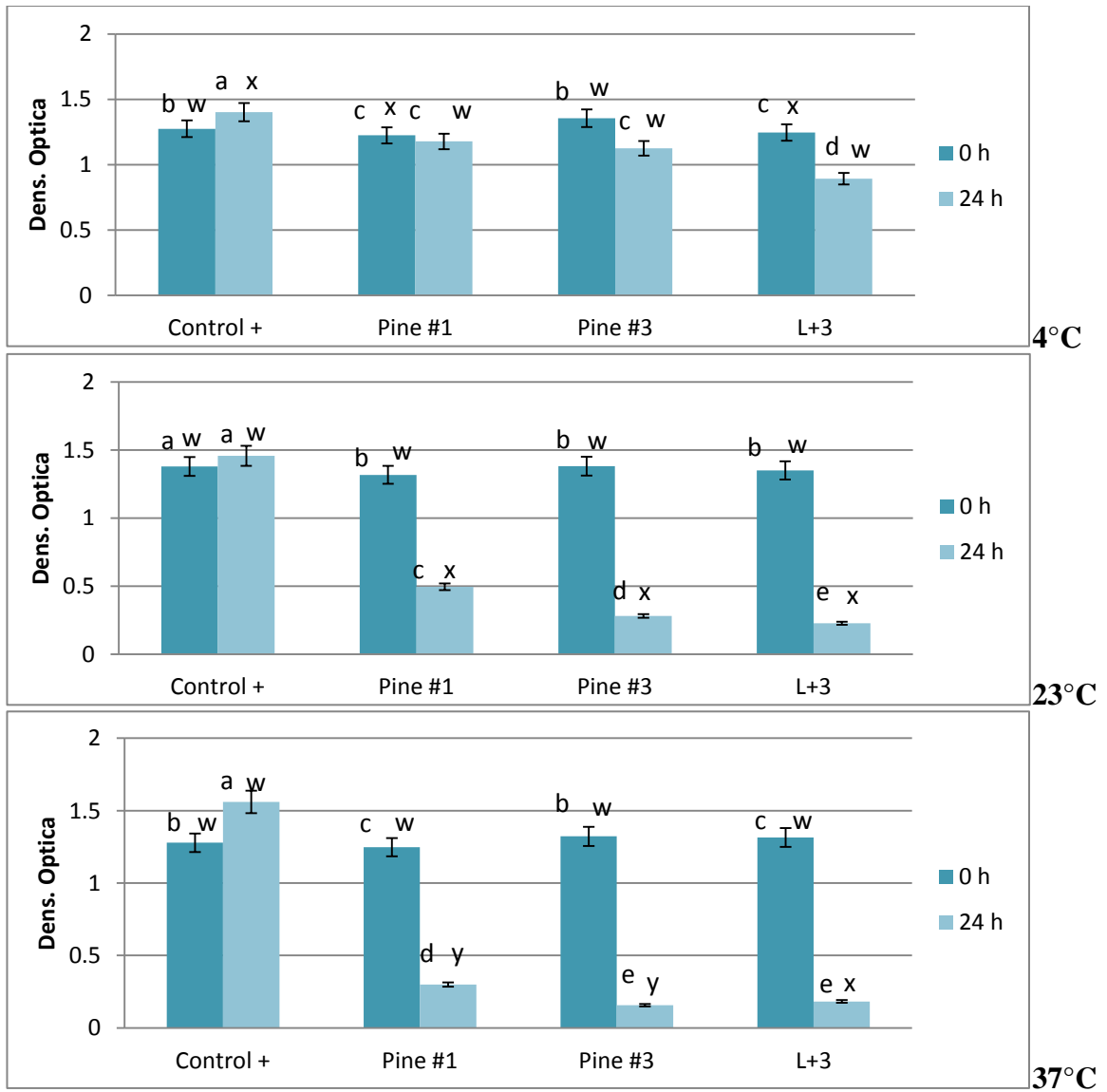


Figura 13. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* utilizando compuestos de pino + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa sin presencia de antimicrobiano

Pino #1: Pinene

Pino #3: A. Pinene

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

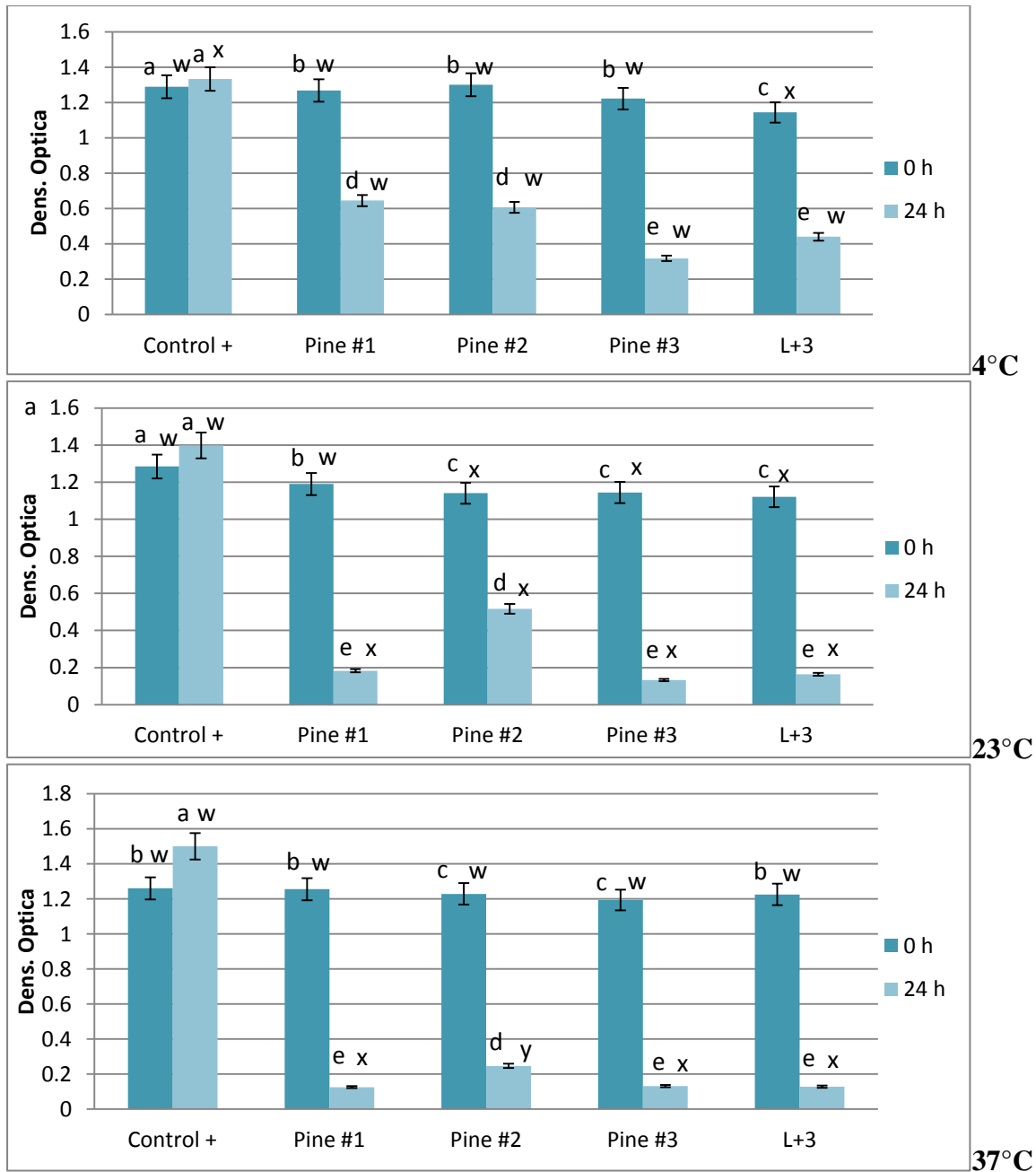


Figura 14. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* 8 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa sin presencia de antimicrobiano

Pino #1: Pinene

Pino #2: Terpineol

Pino #3: A. Pinene

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

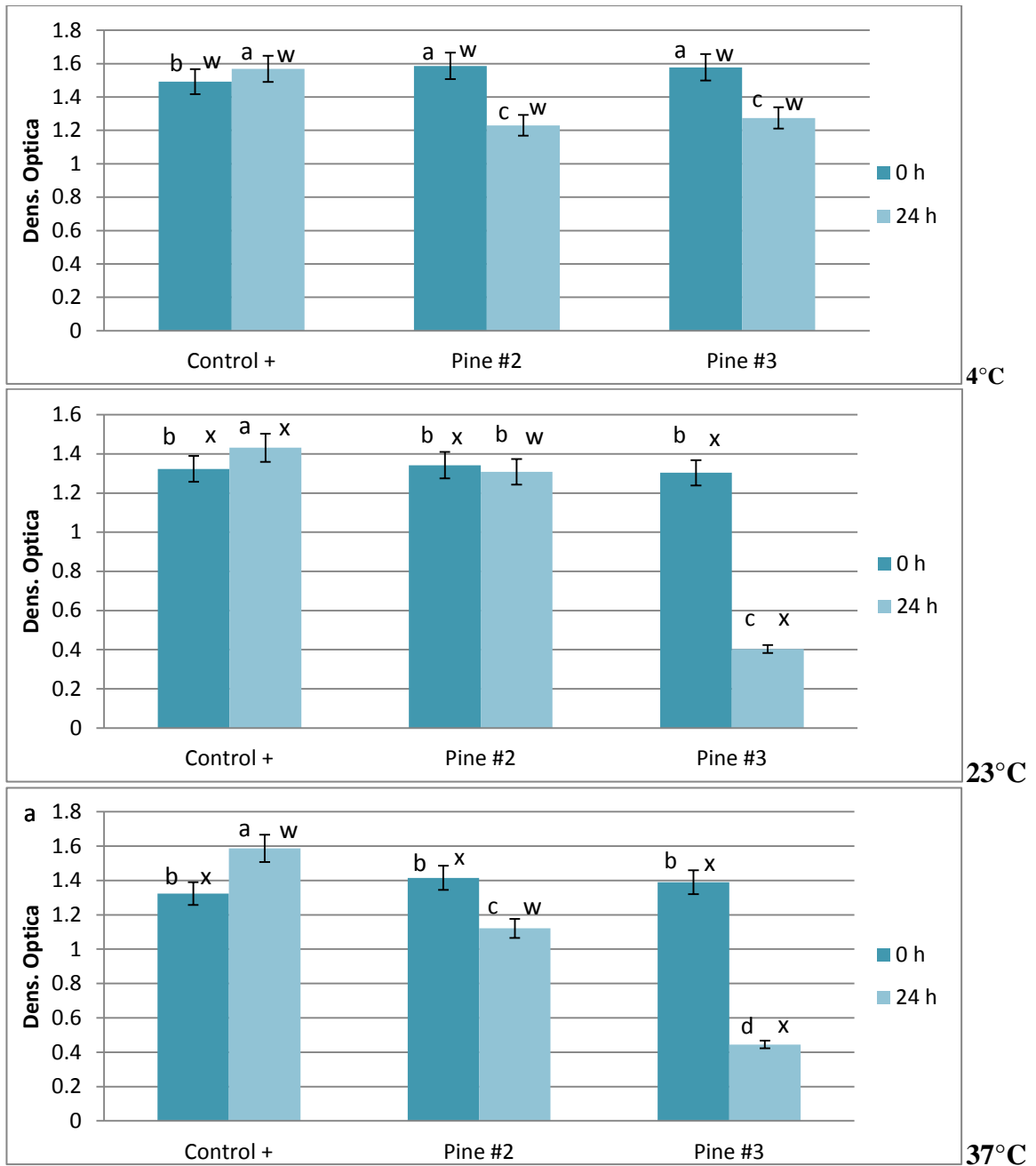


Figura 15. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* 10 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa sin presencia de antimicrobiano

Pino #2: Terpineol

Pino #3: A. Pinene

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

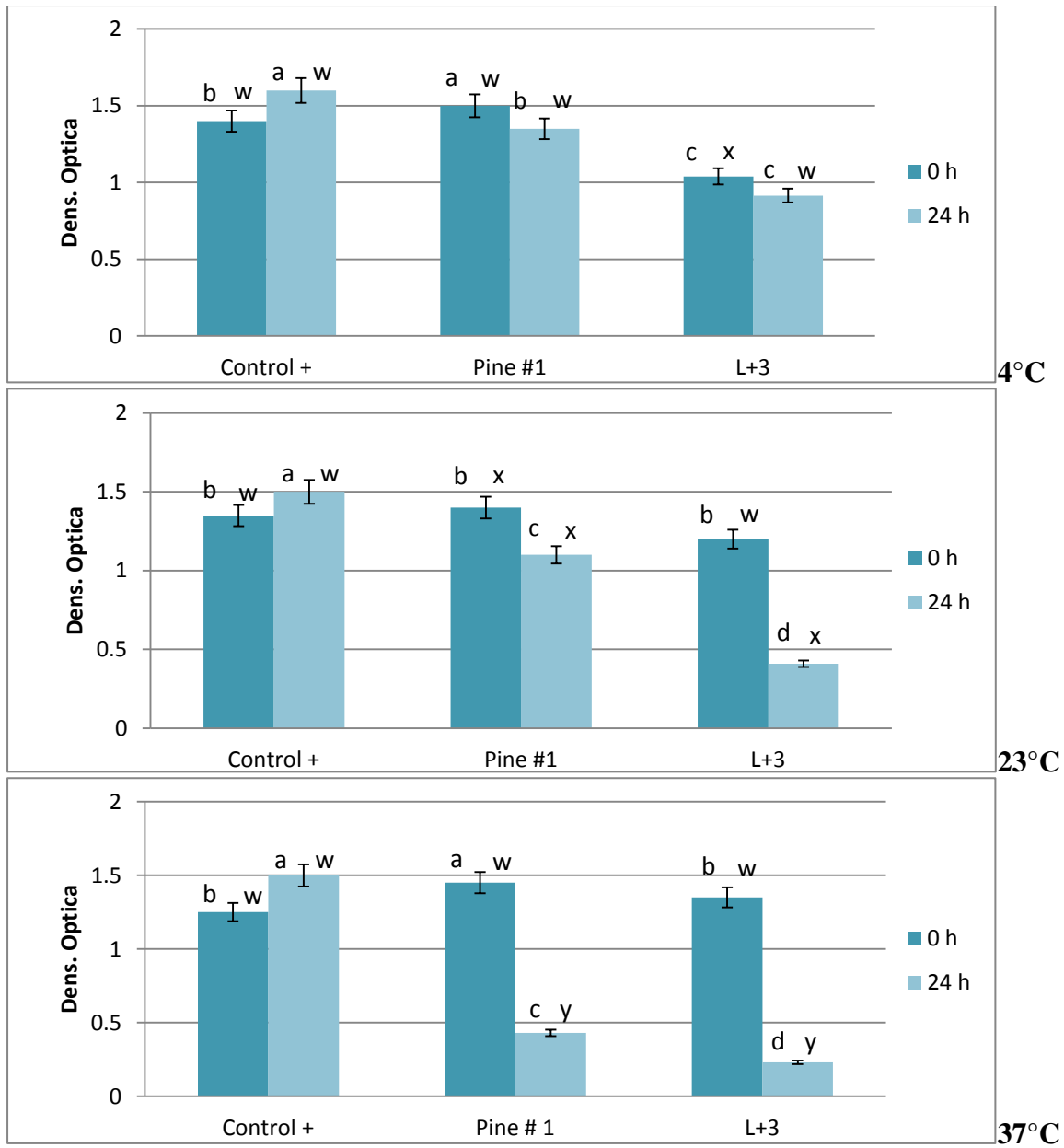


Figura 16. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* 3 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa sin presencia de antimicrobiano

Pino #1: Pinene

Pino #3: A. Pinene

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

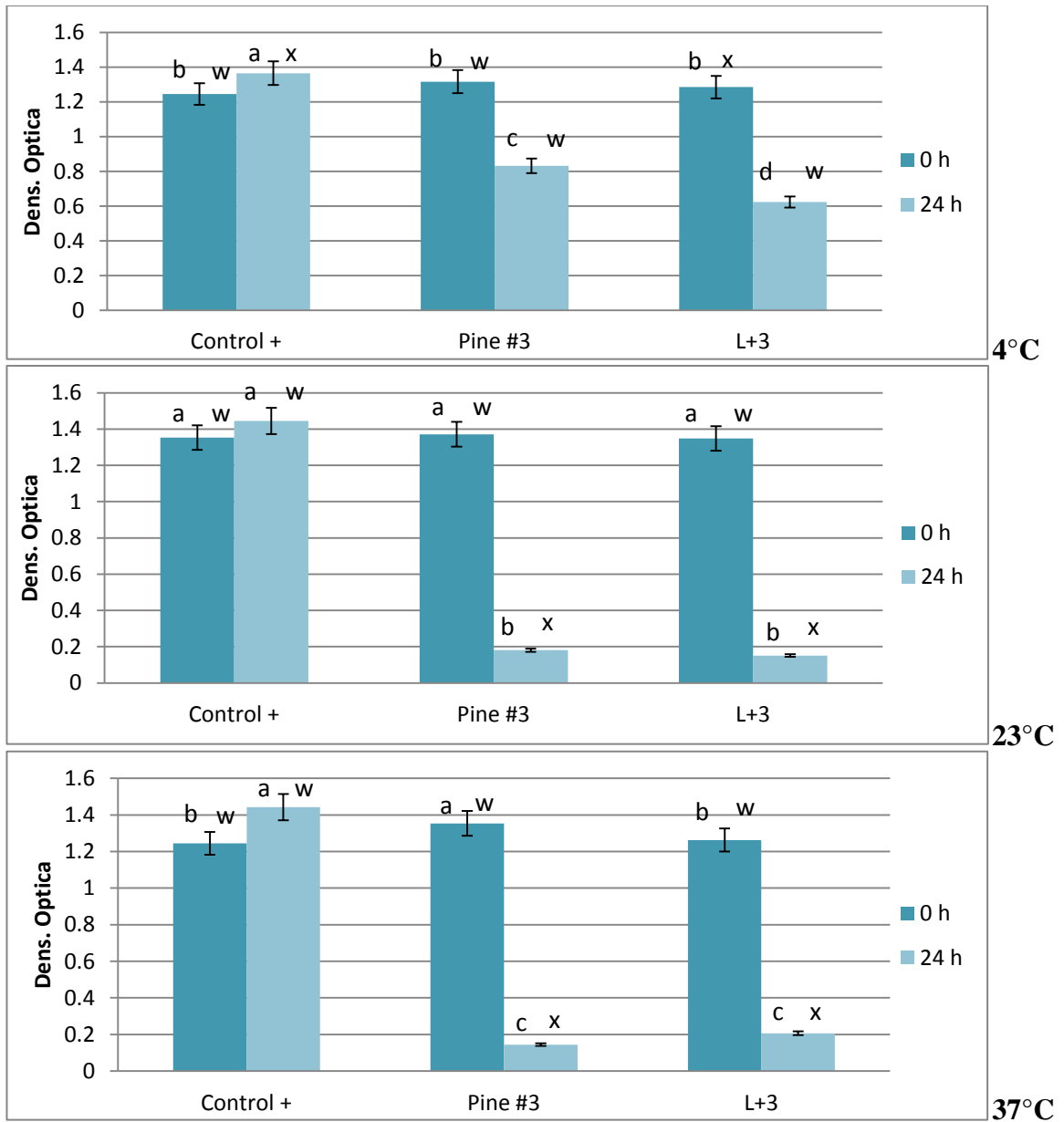


Figura 17. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* L8 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa sin presencia de antimicrobiano

Pino #3: A. Pinene

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

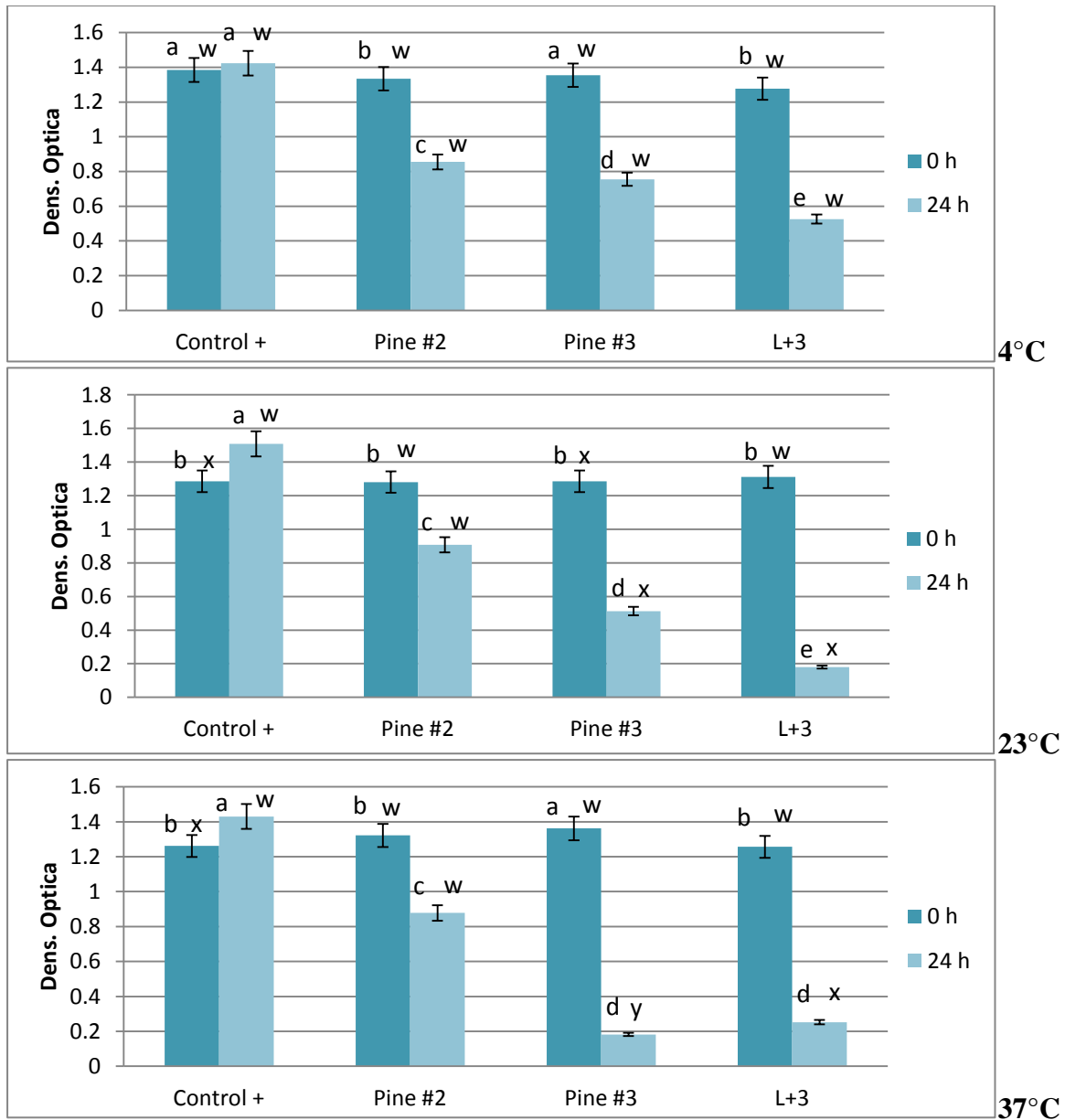


Figura 18. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* 2008 utilizando compuestos de pino + Limonene a tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C)

Control +: Cepa sin presencia de antimicrobiano

Pino #2: Terpineol

Pino #3: A. Pinene

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

Una de las desventajas de utilizar el método de leer Densidad Óptica para observar el comportamiento de un microorganismo es que no se logra distinguir si hay células viables en el sobrenadante estudiado. La disminución de las cepas depende tanto del antimicrobiano, de la temperatura y de la cepa que se está inhibiendo ya que de acuerdo a los compuestos antimicrobianos, las cepas responden susceptibles o resistentes a éstos dependiendo de la respuesta en su membrana citoplasmática y en su pared celular. La aceptabilidad con la que los antimicrobianos logran penetrar y a qué velocidad, también influye la temperatura a la que el *Campylobacter* se encuentre, si está o no en su rango de óptimo de crecimiento y en la interacción de todos estos factores.

El dimetilsulfóxido (DMSO) no influyó en el crecimiento de las cepas y tampoco influyó en la inhibición del crecimiento del mismo. Es evidente que generalmente hay mayor resistencia de las bacterias Gram-negativas a los compuestos esenciales (Narasimham 1992, Wan *et al.* 1998, Davidson y Naidu 2000, Lambert *et al.* 2001, Walsh *et al.* 2003) es probable que se deba en parte a la mayor complejidad de la doble membrana que contienen las Gram-negativas (Vardar y Unlu *et al.* 2003). La resistencia también parece estar relacionada con la velocidad y el grado de la disolución antimicrobiana o la capacidad de partición de la fase lipídica de la membrana (Lambert *et al.* 2001). Estas pueden crear canales lo suficientemente grandes como para permitir que una pequeña parte de los compuestos tengan un paso restringido, como los fenoles de los aceites esenciales, lo que permite su acceso al espacio periplásmico y a la capa de glicoproteína de la membrana citoplasmática.

Las diferencias en la susceptibilidad de las cepas puede resultar de la interacción de varios factores, incluyendo diferencias en la membrana citoplasmática, la interfaz de glicoproteína, así como una mayor complejidad fisicoquímica de la pared celular de las Gram -negativas. Si bien es posible que las diferencias estructurales en las paredes celulares puedan contribuir a la resistencia o sensibilidad a los aceites esenciales, las diferencias metabólicas también pueden ser importantes (Shelef 1983, Blaszyk y Holley 1998). La pérdida del diferencial de permeabilidad de la membrana citoplásmica se identifica con frecuencia como la causa de muerte de la célula. Algunos investigadores han explorado más a fondo, el razonamiento que la pérdida de la función de la membrana es sólo una parte de la explicación para la actividad antimicrobiana (Walsh *et al.* 2003).

Otros eventos que podrían conducir a la destrucción de la membrana y la posterior fragmentación incluyen la disipación de dos componentes de fuerza motriz de protones en las células (el gradiente de pH y el potencial eléctrico) ya sea por los cambios en el transporte de iones o la despolarización a través de cambios estructurales en la membrana, con el sistema de generación de energía (ATP) hay inhibición o la prevención de la utilización del sustrato enzimático para la producción de energía (Helander *et al.* 1998, Lambert *et al.* 2001, Ultee *et al.* 2002). Grupos antimicrobianos con pocas diferencias en la estructura molecular han demostrado ser un valioso enfoque en la comprensión de la base molecular para la actividad antimicrobiana de los componentes. Estudiar este tema daría mejor comprensión del porque hay resistencia o sensibilidad de las especies microbianas.

Compuestos de aceites esenciales ejercen actividad antimicrobiana al interferir con el fosfolípido, la doble capa de la membrana celular, lo que provoca un aumento en la permeabilidad y la pérdida de constituyentes celulares también al alterar una variedad de sistemas enzimáticos incluidos los que participan en la producción de energía y la síntesis de componentes estructurales (Conner y Beuchat 2009) y mediante la inactivación o destrucción de material genético (Kim *et al.* 1995). Sin embargo, el modo de acción es diferente entre los diversos compuestos es por ello que en cada cepa actúan de diferente manera.

Existe una relación entre las estructuras químicas de los compuestos más abundantes en el aceite esencial y la actividad antimicrobiana (Frag *et al.* 1989, Delaquis *et al.* 2002, Hsieh *et al.* 2001) La composición química de los aceites que da lugar a efectos inhibitorios podrían ser debido a la presencia de un compuesto aromático que contiene un grupo funcional polar (Frag *et al.* 1989). Se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de un tipo de compuestos denominados “terpenoides”. Por otro lado varios estudios han demostrado que los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos (Conner y Beuchat 2009). Sin embargo, el mecanismo de acción específico de estos compuestos aún hoy no ha sido claramente caracterizado. Aunque actualmente se propone como posible sitio de acción la membrana celular donde los terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían arribar a la muerte bacteriana (Delaquis *et al.* 2002).

Los tratamientos de congelación y descongelación pueden destruir el microorganismo, y ha sido reportado que las cepas de *Campylobacter* son susceptibles a los mismos (Archer 2004). Recientemente Boysen y Rosenquist (2009) confirmaron que el congelamiento es el tratamiento físico más eficiente para reducir las colonias de *Campylobacter* en condiciones industriales, sin embargo, Bhaduri y Cottell (2004) mostraron que *C. jejuni* puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y congelación ya que estos tratamientos por si solos no son suficientes. Esto puede afectar a las distintas cepas con las que se trabajó ya que se utilizaron diferentes temperaturas desde el congelamiento de la cepa extraída de su preservación hasta llegar a 37 °C.

Las cepas de *Campylobacter jejuni* respondieron más susceptibles a la mayoría de tratamientos con aceites cítricos solos a 37 °C en cambio las cepas de *Campylobacter coli* respondieron mejor ante la acción antimicrobiana de las combinaciones de aceites cítricos + Limonene y esto fue mejor a 23 °C. Las cepas que respondieron mejor a los tratamientos con aceites de pino fueron las *Campylobacter coli* a 37 °C. Se observa una diferencia significativa entre el ensayo de difusión en discos ya que en dicho ensayo se utilizaron todos los aceites sin diluir, es por eso que a mayor concentración hay mayor eficiencia en el efecto antimicrobiano y se ve reflejado en la disminución de las cepas de *Campylobacter jejuni* que fueron las más resistentes en todos los ensayos y también se ve reflejado que estos aceites trabajaron mejor a 37 °C que es el rango de mejor crecimiento de las cepas.

El comportamiento de las cepas de *Campylobacter* en los ensayos de difusión en discos y en los ensayos de disminución de absorbancia (Densidad Óptica) es muy similar el comportamiento de las cepas en ambos ensayos a los 37 °C ya que en ambos ensayos se utilizó dicha temperatura, sin embargo en el ensayo de placas se vio una pequeña disminución de la eficacia antimicrobiana de los aceites ya que estos están diluidos al 5% en DMSO, en cambio en el ensayo de difusión en discos fueron utilizados los aceites puros, es por eso que el comportamiento fue muy similar siendo un poco más efectivo con aceites puros.

Sección 3. Efectos *Campylobacter* en combinación con bacteriófago y con compuestos Cítricos.

Se comparó un bacteriófago vs. Coctel de tres bacteriófagos en cada una de las seis cepas de *Campylobacter* a 37 °C.

La Figura 19 indica la actividad antimicrobiana contra el crecimiento de las seis cepas de *Campylobacter* en la cual se observa mejora en el uso del coctel de tres bacteriófagos vs un solo bacteriófago, ya que tiene una mayor inhibición contra el crecimiento del microorganismo. En el caso de la cepa de *C. jejuni* 3 que ha demostrado anteriormente una resistencia fuerte a los antimicrobianos, demostró que es susceptible a la acción de los bacteriófagos con el coctel, se observa la diferencia de 120 u.f.p./ml entre un bacteriófago individual vs el coctel de tres. Seguido de las mejores cepas *C. coli* 8, *C. jejuni* L8 y *C. jejuni* 2008. Con mejora de 70, 100 y 40 u.f.p./ml de presencia de bacteriófagos respectivamente.

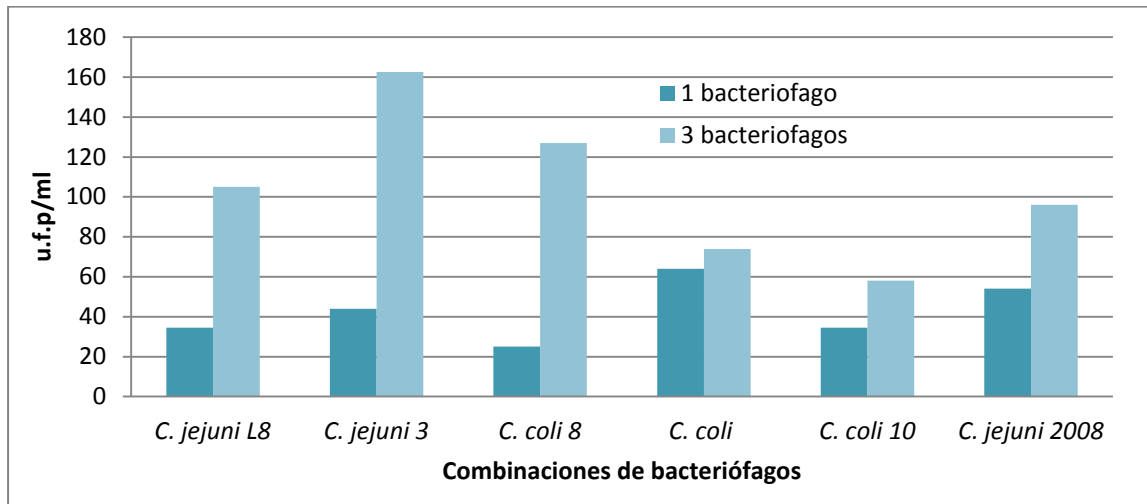


Figura 19. Comparación de un bacteriófago vs. Coctel de tres bacteriófagos contra seis cepas de *Campylobacter*.

Se evaluó la adhesión del bacteriófago en tres cepas de *Campylobacter* (*C. jejuni* L8, *C. jejuni* 3 y *C. coli* 8), fue medido a los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos a 37 °C.

La Figura 20 indica la absorción a los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. Indicando que la mejor adhesión del bacteriófago con cada una de las tres cepas de *Campylobacter* fue entre el tiempo 10 a 40 minutos, siendo la mejor para la cepa *C. coli* 8 ya que se obtuvo mayor cantidad de bacteriófagos presentes en u.f.p/ml a 37 °C. Los tiempos restantes no indican una adhesión significativa.

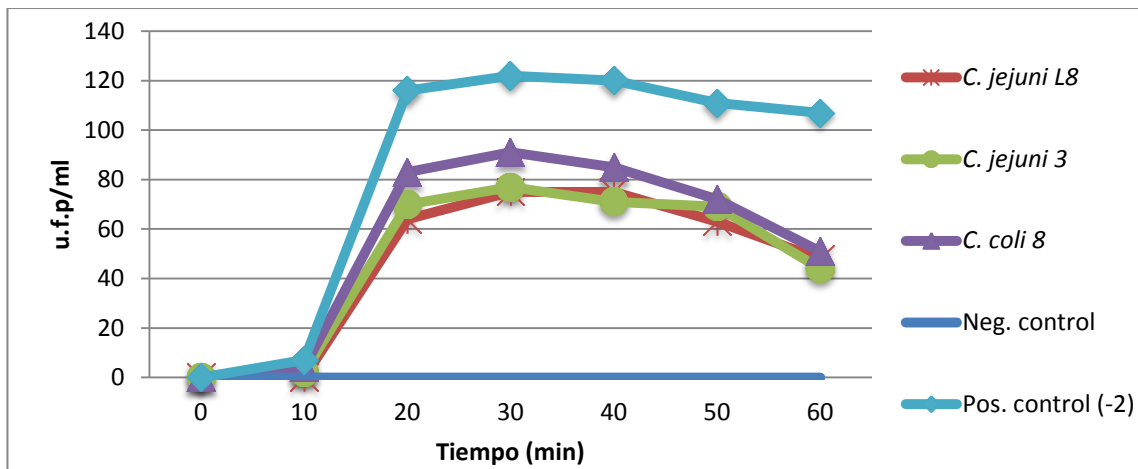


Figura 20. Descripción de la adhesión del bacteriófago para tres cepas de *Campylobacter* (*C. jejuni* L8, *C. jejuni* 3 y *C. coli* 8) con intervalos de 10 minutos en 60 minutos totales a 37°C.

Se evaluó la adhesión del bacteriófago en tres cepas de *Campylobacter* (*C. jejuni* L8, *C. jejuni* 3 y *C. coli* 8), fue medido a las 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas a 37 °C.

La Figura 21 muestra que la mejor adhesión del bacteriófago en las tres cepas se dio entre 2 y 4 horas ya que fue la mayor adhesión. A partir de las 4 horas el bacteriófago continuó adhiriéndose a las cepas de *Campylobacter* y disminuyendo la proliferación del mismo.

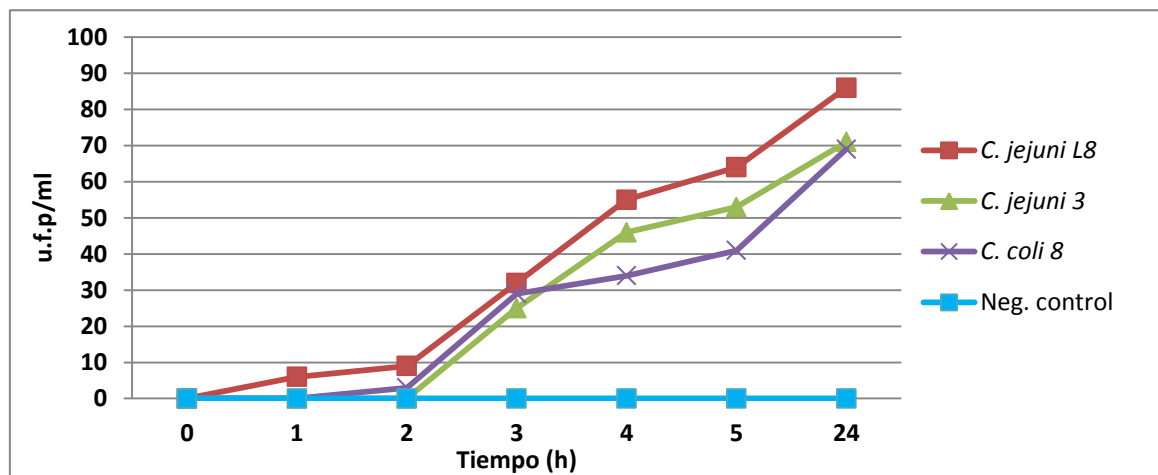


Figura 21. Descripción de la adhesión del bacteriófago para tres cepas de *Campylobacter* (*C. jejuni* L8, *C. jejuni* 3 y *C. coli* 8) con intervalos de 1 hora en 24 horas totales a 37 °C.

Se leyó densidad óptica a 600 nm. Para cada una de las tres cepas de *Campylobacter* (*C. jejuni* L8, *C. jejuni* 3 y *C. coli* 8) en combinación con el coctel de tres bacteriófagos, para observar la disminución de las cepas de *Campylobacter* en presencia del bacteriófago a 37 °C.

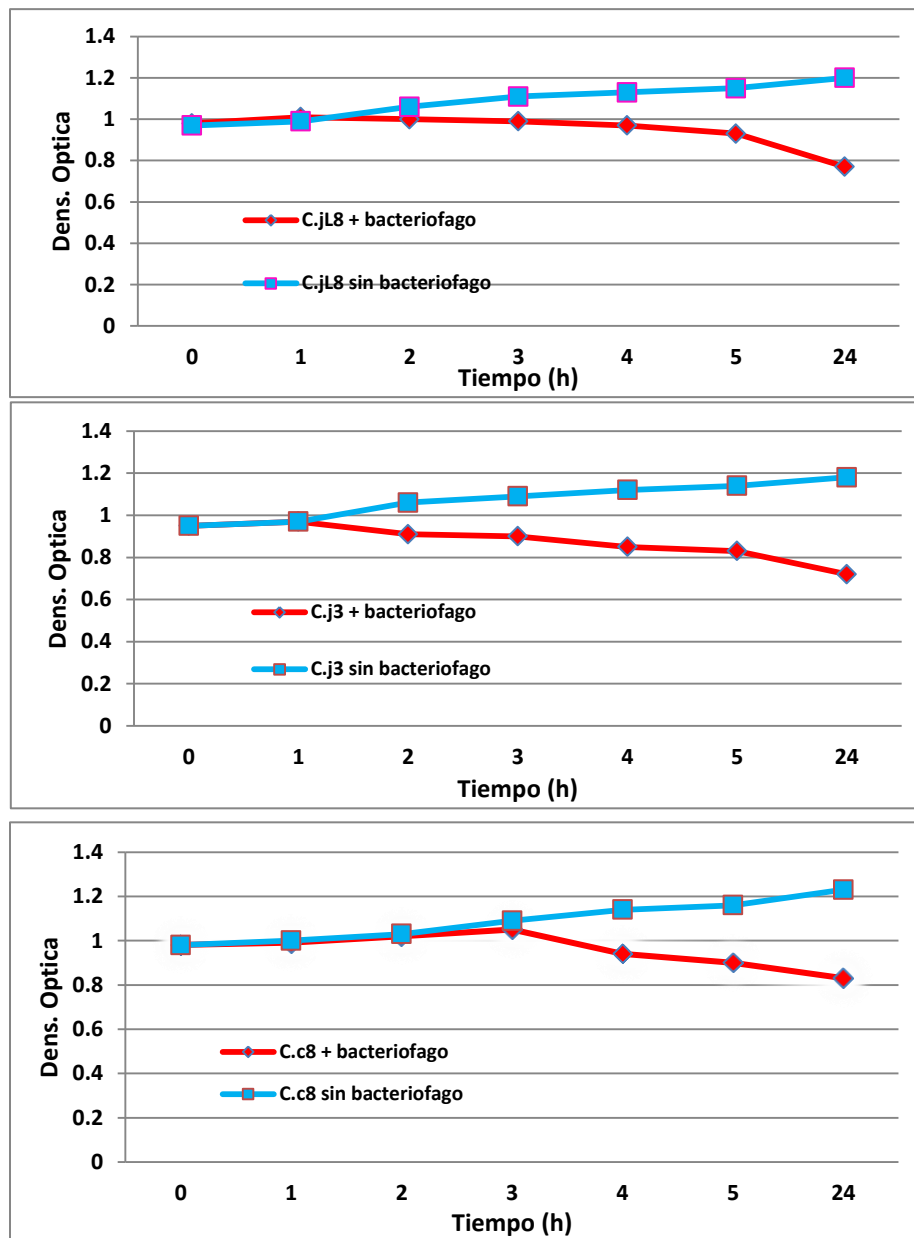


Figura 22. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de tres cepas de *Campylobacter* (*C. jejuni* L8, *C. jejuni* 3 y *C. coli* 8) utilizando el coctel de tres bacteriófagos a 37 °C.

La Figura 22 muestra una disminución significativa del microorganismo a partir de las 2 a las 4 horas en cada una de las tres cepas, en el caso de *C. jejuni* se vio una disminución de su crecimiento a partir de la primera hora a 37 °C.

Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento contra tres cepas de *Campylobacter* (*C. jejuni* L8, *C. jejuni* 3 y *C. coli* 8) utilizando compuestos de pino + Limonene en combinación con coctel de tres bacteriófagos a tres diferentes temperaturas (4, 23 y 37 °C)

La Figura 23 indica el comportamiento del efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos cítricos + bacteriófago para la cepa *Campylobacter jejuni* L8 a las tres diferentes temperaturas (4, 23, 37 °C) y a tres tiempos (0, 3 y 24 horas) en la medición de densidad óptica. Indicando que los mejores tratamientos fueron el compuesto A. Terpeneol a las 24 horas a 37 °C y la combinación de D. Aldehyde + Citral mostró su mayor eficiencia a las 24 horas a 37 °C. La Figura 24. Indica el efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos cítricos + bacteriofago para la cepa *Campylobacter jejuni* 3 indicó que los mejores tratamientos fueron el compuesto Citral a las 24 horas a 23 °C y a las 3 horas a 23 °C.

La Figura 25 muestra el comportamiento del efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos cítricos + bacteriofago para la cepa *Campylobacter coli* 8 indicando que los mejores tratamientos fueron el aceite A. Terpeneol a las 24 horas a 23 y 37 °C, Citral mostró su mayor eficiencia a las 3 horas a 4 °C y el aceite D. Aldehyde a las 24 horas a 4 °C, en dichos tratamientos se muestra la mayor disminución del crecimiento del microorganismo. Las demás temperaturas y tiempos tuvieron efecto positivo pero promedios menores de disminución del microorganismo. Se observa el comportamiento del control negativo que crece normalmente y que el diluyente DMSO no afecta el crecimiento normal del microorganismo.

La presencia de una concentración absoluta alta de bacteriófagos de alta densidad celular da lugar a una mayor proporción de las células huésped a ser infectados y tener una mejor lisis. Muchas veces los patógenos se lesionan pero no mueren, pueden conducir a la aparición de células más maduras y tal vez más virulenta (Archer 1996).

Algunas de las condiciones experimentales utilizadas no eran particularmente realistas para aplicaciones a alimentos. Por ejemplo alimentos no se almacenan normalmente a temperatura ambiente durante 24 horas, aunque el objetivo de esas condiciones fue evaluar posible re-crecimiento del huésped. Sin embargo, el trabajo buscó determinar, en principio, si los bacteriófagos son capaces de controlar los agentes patógenos, y los datos sugieren que este puede ser el caso para los alimentos, tanto en temperaturas de refrigeración y en casos extremos fuera de ésta por algún descuido a lo largo del proceso.

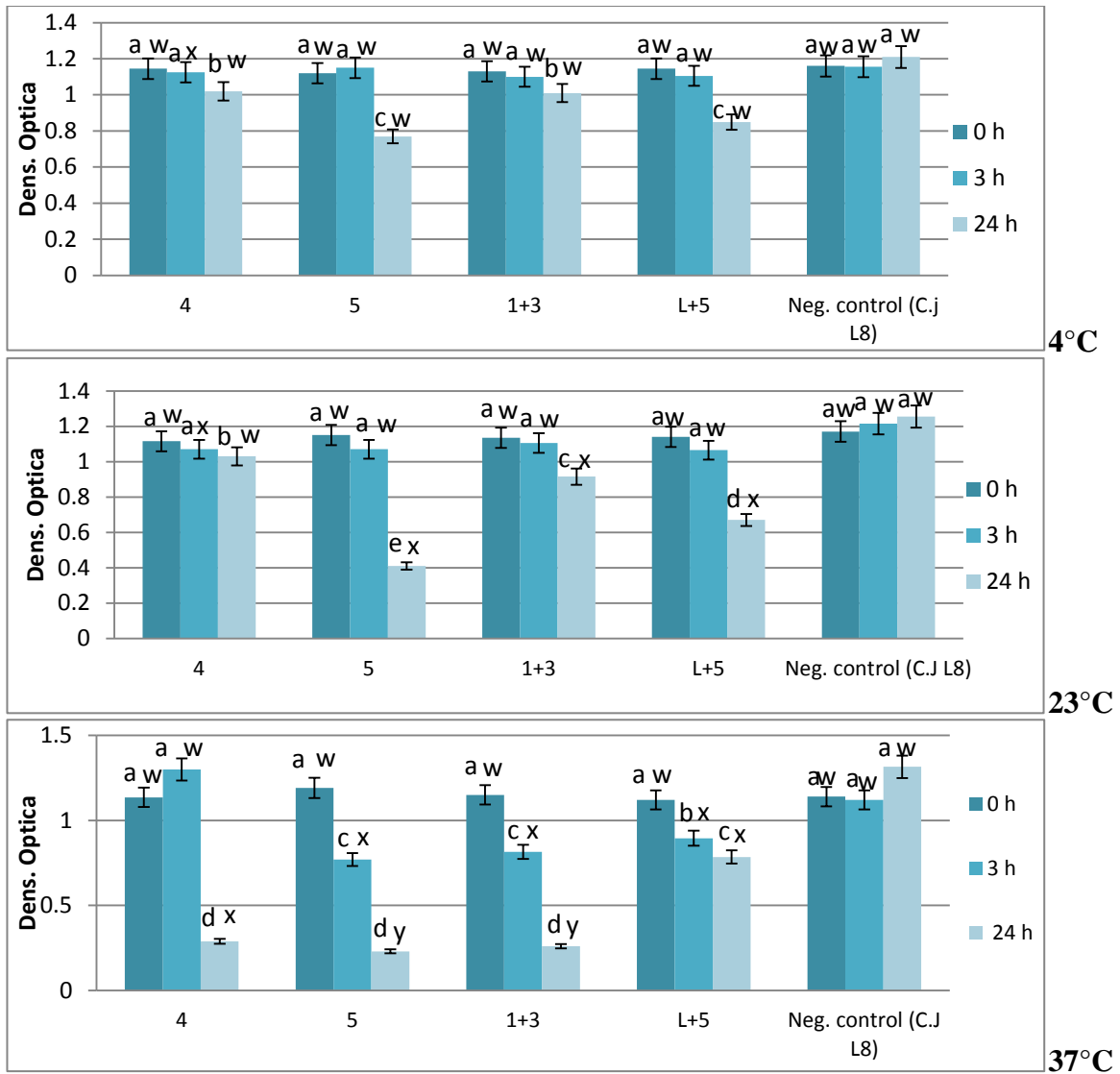


Figura 23. Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* L8 utilizando compuestos cítricos + coctel de tres bacteriófagos a tres diferentes temperaturas (4 °C, 23 °C, 37 °C)

Neg. Control: cepa sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #1: D. Aldehyde

Cítrico #3: Citral

Cítrico #4: Decanal

Cítrico #5: A. Terpeneol

L: Limonene

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

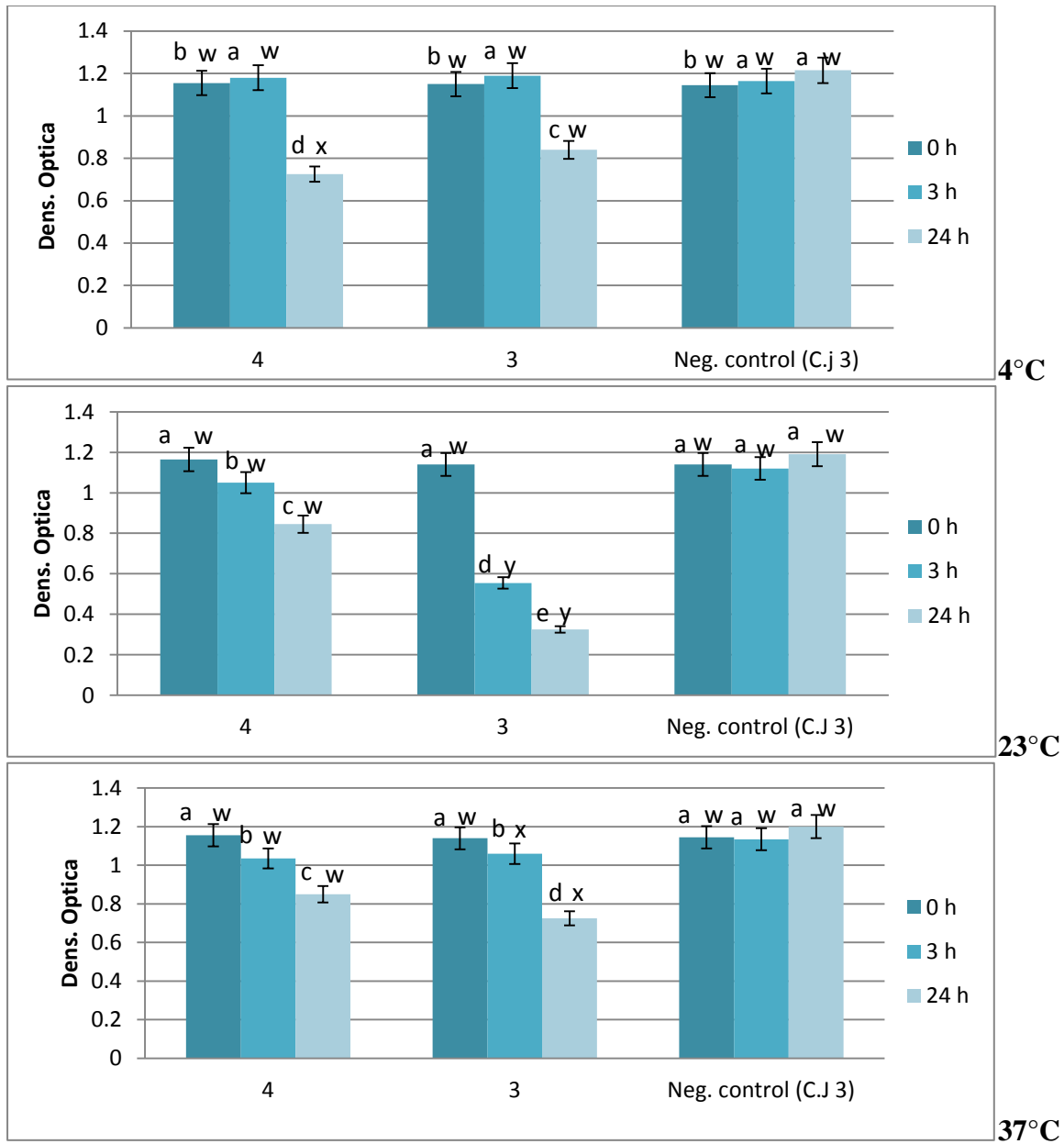


Figura 24. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter jejuni* 3 utilizando compuestos cítricos + coctel de tres bacteriófagos a tres diferentes temperaturas (4 °C, 23 °C, 37 °C)

Neg. Control: cepa sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #3: Citral

Cítrico #4: Decanal

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

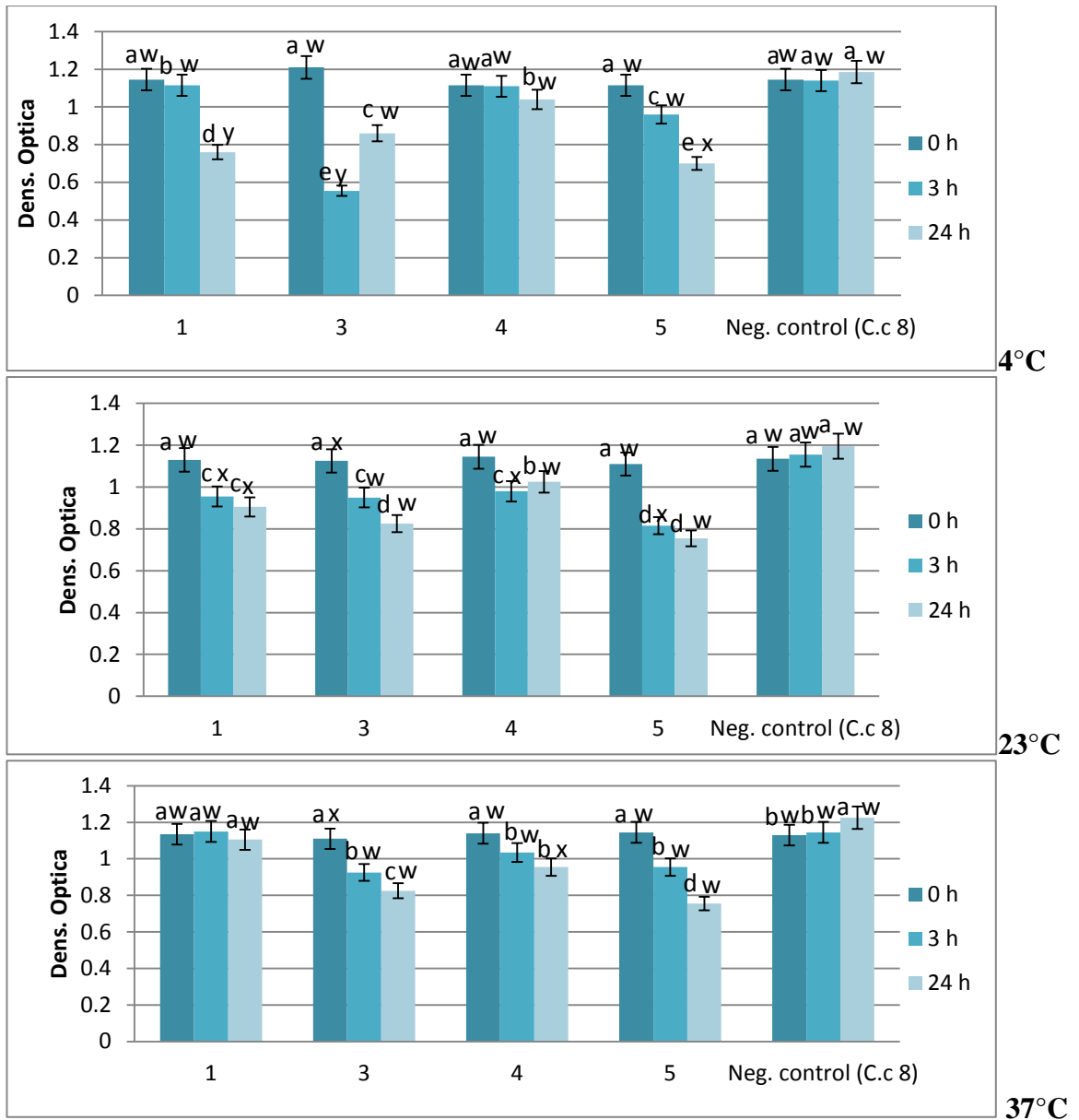


Figura 25. Lectura de Densidad Óptica de inhibición de crecimiento de *Campylobacter coli* 8 utilizando compuestos cítricos + coctel de tres bacteriófagos a tres diferentes temperaturas (4 °C, 23 °C, 37 °C)

Neg. Control: cepa sin presencia de antimicrobiano

Cítrico #1: D. Aldehyde

Cítrico #3: Citral

Cítrico #4: Decanal

Cítrico #5: A. Terpeneol

Medias con diferente letra (a – f) en orden horizontal y letras (w – z) en orden vertical son estadísticamente diferentes.

Es necesario seguir trabajando para optimizar la capacidad de los bacteriófagos para inactivar agentes patógenos en los alimentos. En particular, la investigación es necesaria en condiciones más realistas para maximizar la probabilidad de entregar el número requerido de bacteriófagos por célula para causar que resulte en una infección letal. Parece que es razonable temer que el desarrollo de resistencia en respuesta a la inactivación parcial podría ocurrir. Es bien conocido que las bacterias patógenas son capaces de percibir y responder rápidamente a los cambios físicos y químicos. Los tratamientos que inactivan parte de una población bacteriana y crean distintas subpoblaciones dentro de la cultura tratada promueven el desarrollo de resistencia (Skandamis *et al.* 2008, Sundin y Weigand 2007).

Esto está apoyado por estudios que sugieren que las respuestas al estrés bacterianos pueden seleccionar hipermutabilidad, modo en cómo se adapta el sistema inmune a nuevos elementos extraños. Su función es diversificar los receptores que usa el sistema inmunitario para reconocer elementos extraños y permite al sistema inmune adaptar su respuesta a las nuevas amenazas que se producen a lo largo de la vida de un organismo (Boles y Singh 2008, Chung *et al.* 2006, Foster 1995, Moxon *et al.* 1994). Las cepas que presentaron mayor resistencia fueron *Campylobacter jejuni* ya que estas cepas crecen a mayor temperatura.

Se observó una mayor disminución del crecimiento de las cepas a 23 °C y 37 °C, siendo mejor la última temperatura ya que está dentro del rango de crecimiento de *Campylobacter* y por consiguiente de sus bacteriófagos específicos también, es por eso que hubo mayor actividad de los mismos dentro de su rango óptimo de crecimiento y desarrollo. Se observa una mejora en la inhibición del *Campylobacter* con el sinergismo del bacteriófago, a comparación de los ensayos previos en este estudio se observa que hubo mayor inhibición del crecimiento de las cepas.

No se tiene información clara si los compuestos de los aceites esenciales afectan directamente al bacteriófago al igual que al hospedero, ya que la densidad óptica fue mayor en esta etapa de la investigación porque el volumen fue mayor en combinación con las cepas de *Campylobacter*, los bacteriófagos y los aceites esenciales, por tal motivo la densidad disminuyó aún mas, pero hace falta investigar si el bacteriófago tiene un sinergismo positivo en presencia de los compuestos esenciales o ver si estos se ven afectados al igual que el *Campylobacter*.

4. CONCLUSIONES

- Compuestos de pino y cítricos tuvieron efecto antimicrobiano contra *Campylobacter* ya que la mayoría de las cepas mostraron sensibilidad.
- Los mejores resultados fueron con las combinaciones de los componentes cítricos entre sí, estos tienen un sinergismo mayor en su combinación, ya que la mayoría de las cepas fue susceptible a los tratamientos mostrando mayor inhibición de crecimiento.
- Aceites cítricos individuales diluidos y sin diluir trabajaron mejor en las cepas de *Campylobacter jejuni* a 37 °C
- Aceites cítricos + Limonene trabajaron mejor contra el crecimiento de las cepas de *Campylobacter coli* a 23 °C.
- Aceites de pino trabajaron mejor disminuyendo el crecimiento de las cepas de *Campylobacter coli* a 37 °C.
- Hubo mejor inhibición de *Campylobacter* en todos los tratamientos después de 24 horas.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayo para determinar la viabilidad de los bacteriófagos en presencia de componentes antimicrobianos para verificar si hay sinergismo entre la combinación o si los bacteriófagos son inhibidos en su desarrollo.
- Realizar el ensayo del sinergismo de los mejores resultados obtenidos con componentes de pino y mezclarlo con el bacteriófago específico de *Campylobacter*, aplicarlo a las cepas a las tres diferentes temperaturas y comparar cual combinación es la más efectiva, si fue con cítricos o si el sinergismo es mejor con pinos contra el crecimiento de *Campylobacter*.
- Estudiar la disminución del crecimiento de *Campylobacter* en presencia de los diferentes tratamientos con una metodología diferente a la lectura de densidad óptica, para verificar si efectivamente se logra disminuir de 1 a 2 logaritmos como lo dicta el Departamento de Agricultura y ganadería (USDA, por sus siglas en inglés).
- Evaluar los compuestos y sus mejores combinaciones directamente a canales de pollo, como estudio preliminar en laboratorios y cuantificar la reducción de la prevalencia de *Campylobacter* en logaritmos para evaluar la eficiencia de los compuestos antimicrobianos.
- Implementar la aplicación de este estudio directamente al procesamiento e industria de pollos después de evaluar la eficiencia en las canales de pollo en laboratorio si éste fuese efectivo.
- Establecer una metodología que garantice la efectividad antimicrobiana de los compuestos antes de las 24 horas, para que éstos sean utilizados en la industria y procesamiento del pollo para lograr sustituir antimicrobianos sintéticos como el ácido acético en las canales.

6. LITERATURA CITADA

Archer, D.L., 2004. Preservation microbiology and safety. Evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends Food Science and Technology*. 7, 91–95. 234 p.

Arritt, T.E., 2002. Different methods to reduce the prevalence of pathogens agents at food processing. Thesis of Food Science and Technology department. University of Illinois. Champaign, Illinois. United States of America. 123 p.

Atterbury, R.J., Connerton, P.L., Dodd, C.E., Rees C.E. Connerton I.F. 2003. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied Environmental Microbiology*. Vol 69. 6302-6306. 400 p.

Atterbury, R.J., Connerton, P.L., Dodd, C.E., Rees C.E. Connerton, I.F. 2003. Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. *Appl Environ Microbiol* Vol. 69. 4511-4518. 500 p.

Batz, M.B., 2011. Ranking the risks: the 10 pathogen-food combinations with the greatest burden on public health. (en línea) disponible en: <https://folio.iupui.edu/bitstream/handle/10244/1022/72267report>

Bhaduri, S., Cottrell, B., 2004. Survival of cold-stressed *Campylobacter jejuni* on ground chicken and chicken skin during frozen storage. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7103-7109. 9076 p.

Blaszyk, M., Holley, R.A., 1998. Interaction of monolaurin, eugenol, and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *International Journal of Food Microbiology* 39, 175–183. 200 p.

Boles, B.R., Singh, P.K., 2008. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Processes of National Academy of Science*. U.S.A. 105, 12503–12508. 16548 p.

Boysen, U.E, Rosenquist, J.G., 2009. Effect of bacteriophage specific for *Salmonella*, *Campylobacter*, *Arcobacter* and *E. coli*. *Applied Environmental Microbiology* Vol. 34. 230-345. 400 p.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review in press. *International Journal of Food Microbiology*. 94 (3). 223–253. 280 p.

Chung, H.J., Bang, W., Drake, M.A., 2006. Stress response of *Escherichia coli*. *Review of Food Science and Food Safety* 5. 52–64. 180 p.

Conner, D.E., Beuchat, L.R., 2009. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*. 49, 429–434. 2876 p.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Revue*. 12 (4), 564–582. 800 p.

Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, T.R., Wyllie, S.G., 2000. The mode of antimicrobial R.A. Holley, D. Patel / *Food Microbiology* 22 (2005) 273–292 289 action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88, 170–175. 239 p.

Davidson, P.M., Naidu, A.S., 2000. Phyto-Phenols. In: Naidu, A.S. (Ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 265–294. 800 p.

Delamare, S.G., Noble, R.C., Hiltunen, R., Wuryani, W., Penzes, L.G., 2005. Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. *Flav. Frag. Journal*. 10, 323–328. 678 p.

Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74, 101–109. 549 p.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88, 308–316. 765 p.

Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A., Mount, J.R., 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*. 64, 1019–1024. 3874 p.

Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewed, F.M., El-Baroty, G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice oils. *Journal of Food Protection*. 52, 665–667. 9087 p.

Fisher, K., 2007. The effect of essential oils against *Campylobacter spp.* in raw chicken. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 104: 3490-3569. 4500 p.

Fisher, K., Phillips, C.A., 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in

vitro and in food systems. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 101: 1232-1240. 3000 p.

Foster, U.I., 1995. Economic cost of Guillain-Barré syndrome in the United States. *Neurology*. Vol 71, 21-27. 435 p.

Friedman, C.R., Hoekstra, R.M., Samuel, M., Marcus, R., Bender, J., Shiferaw, B., Reddy, S., Ahuja, S.D., Helfrick, D.L., Hardnett, F., Carter, M., Anderson, B., Tauxe, R.V., 2002. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case-control study in food net sites. *Clinical Infectious Diseases* 38 (Suppl. 3), S285-S296. 8976 p.

Gill, C.O., Tan, K.H., Ferrett, J., 2002. Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 39 (2), 317–319. 876 p.

Goode, D., Allen, V.M., Barrow, P.A. 2003a. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied of Environmental Microbiology*. Vol. 69, 5032-5036. 9850 p.

Goode, O.E., Frett, T.D., Gutierrez, E.O., Barchenguer, A.P., 2003b. Study of different concentration of bacteriophage in combination with organic antimicrobial. Thesis of Food Science and Technology department. University of Kansas. Manhattan, Kansas. United States of America. 123 p.

Gould, U. I., 1996. Anti *Salmonella* and *Campylobacter Coli* effects of pine oil. *Journal of Food Science*. Vol 21. 34-89. 800 p.

Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N., 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in *Campylobacter*. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 48. 34-80 p. 168 p.

Guerin, M.T., Sir, C., Sargeant, J.M., Waddell, L., O'Connor, A.M., Wills, R.W., Bailey, R.H., Byrd, J.A. 2010. The change in prevalence of *Campylobacter* on chicken carcasses during processing: A systematic review. *Poultry Science*. Vol. 89, 1070-1084. 3000 p.

Hazeleger W, Arkesteijn C, Toorop B, and Beumer R. 1998. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*. 24, 273–281. 700 p.

Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Wright, A.V., 1998. Determining their antimicrobial activity. *Flavonoid Fragment*. J. 14, 322–332. 845 p.

Holley, R.A., Patel, D., 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22, 273–292. 522 p.

Hsieh, S. Y., Kim, K.J., Lee, S., Ryu, S. 2001. Isolation and characterization of bacteriophages specific for *Campylobacter jejuni*. *Microbiology and Immunology*. Vol. 53. 559-563. 980 p.

Hwang, J.O., 2009. Food Microbiology and Food Safety Into the Next Millennium. Proceedings of the 17th International Conference, 290 R.A. Holley, D. Patel / *Food Microbiology* 22 (2005) 273–292.

Kemp, H.A., 2000. Prevalence of *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to antimicrobial methods. *Food Microbiology* Vol. 10. 170-189. 2300 p.

Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C.-I., 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemical*. 43, 2839–2845. 6782 p.

Klancnik, A., Guzej, B., Jamnik, P., Vuckovi_c, D., Abram, M., Mozina, S.S., 2009. Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. *Research in Microbiology* 160, 345-352. 783 p.

Krameret, C.D., 2000. Relationship between processing and contamination with pathogen agents. Thesis of Food Science department. University of Arkansas. Fayetteville, Arkansas. United States of America. 79 p.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal Applied for microbiology*. Vol. 77, No.10. 50 p.

Lee, V.M., James, G.T., Zhimmer, N.J., Ferrett, T.W., 1998. The effect of Garlic oil against *E. coli*, *Salmonella* and *Campylobacter jejuni*. Thesis of Food Science and nutrition department. Knoxville, Tennessee. United States of America. 112 p.

Lipoglavsek, H.E., Mozina, S.J., 2010. Compound of different essential oils against tree microorganisms. Thesis. University of Illinois. 139 p.

Mourey, M.R., Canillac, H.U., 2002. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT–Food Science and Technology* 38(5), 565–570. 1287 p.

Moreira, J.O., 2005. Efficacy of a herbal extract on the microbiological quality of broiler carcasses during a simulated chill. *Poultry Science*. 79, 1200–1203. 6549 p.

Moxon, E.R., Rainey, P.B., Nowak, M.A., Lenski, R.E., 1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curriculum of Biology*. 4, 24–33. 237 p.

Mozina, J.E., Almeida, G., Gibson, K.E., and Ricke, S.C. 2009. Characterization of *Campylobacter*-Specific Bacteriophage. Thesis of department of Food Science. University of Arkansas. Fayetteville, Arkansas. United States of America. 92 p.

Nachamkin, I. 1995. *Campylobacter* enteritis and the Guillain–Barré syndrome. *Current Infections Diseases*. Vol. 3. 116–122. 897 p.

Nannapaneni, R., 2005. Concurrent quantitation of total *Campylobacter* and total ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* loads in rinses from retail raw chicken carcasses from 2001 to 2003 by direct plating at 42 degrees C. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 71. 4510-4515. 8900 p.

Narasimhan, R., Chalova, V.I., Crandall, P.G., Ricke, S.C., Johnson, M.G., O'Bryan, C.A. 1992. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 129. 43-49. 876 p.

Nguyen, J.L., Willson, O.H., Frett, T.O., 2006. Strategies to reduce *Campylobacter* spp. using natural methods in the processing. *Journal of Environmental Science and Health, Part D*. Vol. 25. 1780 p.

Olasupo, E.G., 2003. New natural methods against pathogens using in meat processing. Thesis of Food Science and Technology department. University of Nebraska. Lincoln, Nebraska. United States of America. 127 p.

Oussalah, R.K., 2006. Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* using essential oils *in vivo*. *American Society for Microbiology*. Vol. 98, No.87. 598 p.

Patel, O.L., 2005. Antimicrobial susceptibility of different compounds against microorganisms. Thesis of Food Science department. University of Amsterdam. Amsterdam. Holanda. 168 p.

Ricke, J. 2005^a. Bacteriophage against *E. coli* and *Campylobacter coli*. Thesis of Food Science department. University of Ljubljana, Slovenia. 150 p.

Ricke, J., 2003^b. Antimicrobial effects of different extracts from garlic and onion. *American Society for Microbiology*. Vol. 83, No.6. 50 p.

Ricke, R.E., 2003^c. Activity of some essential oil components against *Campylobacter* as foodborne pathogen. *Research in Pathogens*. Vol. 9. 345-398. 896 p.

Scherer, G. 2006. *Campylobacter* in poultry flock. *American Society for Microbiology*. Vol. 87, No. 30. 120 p.

Shelef, L.A., 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6, 29–44. 78 p.

- Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology* 25, 294–303. 800 p.
- Smith, K.I., Palmer, O.P., Archer, J.E., 1998. Ciprofloxacin-sensitive and ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* are equally susceptible to natural orange oil-based antimicrobials. *J Env Sci Health Part B*. Vol. 44. 571-577. 1260 p.
- Stern, H.O. 2007. *Campylobacter* in raw meat and different solution for the public health. Thesis of Food Science and Technology department. University of Kansas. Manhattan, Kansas. United States of America. 129 p.
- Sundin, G.W., Weigand, M.R., 2007. The microbiology of mutability. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 11–20.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–1568. 2865 p.
- USDA. 2012. Performance standards for *Salmonella* and *Campylobacter* in chilled carcasses at young chicken and turkey slaughter establishments. (En línea) disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISNotices/54-12.pdf>
- Vardar-Unlu, G., Candan, F., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, M., Donmez, E., Tepe, B., 2003. Antimicrobial and antitoxic activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. pectinatus (Lamiaceae). *Journal of Agricultural Food Chemical.* 51, 63–67. 549 p.
- Vliet, O.K., Ketley, V.U., 2001. Presence of pathogens in raw meat and control. The microbiology of mutability. *FEMS Microbiology Letter.* Vol. 34, 26-50. 98 p.
- Walsh, S.E., Maillard, J.-Y., Russell, A.D., Catrenich, C.E., Charbonneau, D.L., Bartolo, R.G., 2003. Activity and mechanism of action of selective biocidal agents on Gram-positive and –negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94, 240–247.
- Wan, H. U., M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. 1998. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetable with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiology.* 149-157. 578 p.
- Wassenaar, G.J, Blaser, S.P. 1999. Effectiveness of Bacteriophage against *E. coli* O 157: H7. *Food Microbiology.* 47, 347 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Interacción de factores que tuvieron la mayor influencia en el comportamiento de la disminución de seis cepas de *Campylobacter* utilizando compuestos cítricos.

Interacciones	$P \leq (0.05)$
Aceite	<.0001
Cepa	<.0001
Aceite*cepa	<.0001
Rep	0.7005
Aceite*rep	0.86
cepa*rep	0.4199

Anexo 2. Interacción de factores que tuvieron la mayor influencia en el comportamiento de la disminución de seis cepas de *Campylobacter* utilizando compuestos cítricos + Limonene.

Interacciones	$P \leq (0.05)$
Aceite	<.0001
Cepa	<.0001
Aceite*cepa	<.0001
Rep	0.7005
Aceite*rep	0.86
cepa*rep	0.4199

Anexo 3. Interacción de factores que tuvieron la mayor influencia en el comportamiento de la disminución de seis cepas de *Campylobacter* utilizando combinaciones de compuestos cítricos.

Interacciones	$P \leq (0.05)$
Aceite	<.0001
Cepa	<.0001
Aceite*cepa	<.0001
Rep	0.7005
Aceite*rep	0.86
cepa*rep	0.4199

Anexo 4. Interacción de factores que tuvieron la mayor influencia en el comportamiento de la disminución de seis cepas de *Campylobacter* utilizando compuestos de pino.

Interacciones	$P \leq (0.05)$
Aceite	<.0001
Cepa	<.0001
Aceite*cepa	<.0001
Rep	0.7005
Aceite*rep	0.86
cepa*rep	0.4199

Anexo 5. Interacción de factores que tuvieron la mayor influencia en el comportamiento de la disminución de seis cepas de *Campylobacter* utilizando compuestos de pino + Limonene.

Interacciones	$P \leq (0.05)$
Aceite	<.0001
Cepa	<.0001
Aceite*cepa	<.0001
Rep	0.7005
Aceite*rep	0.86
cepa*rep	0.4199

Anexo 6. Interacción de factores que tuvieron la mayor influencia en el comportamiento de la disminución de seis cepas de *Campylobacter* utilizando combinaciones de compuestos de pino.

Interacciones	P≤(0.05)
Aceite	<.0001
Cepa	<.0001
Aceite*cepa	<.0001
Rep	0.7005
Aceite*rep	0.86
cepa*rep	0.4199

Anexo 7. Interacción de factores que tuvieron la mayor influencia en el comportamiento de la disminución de seis cepas de *Campylobacter* utilizando combinaciones de compuestos de pino y Limonene a tres diferentes temperaturas (4 °C, 23 °C y 37 °C) a dos tiempos diferentes (0 y 24 horas).

Interacciones	P≤(0.05)
Comb	<.0001
Cepa	<.0001
Temp	<.0001
Tiempo	<.0001
comb*cepa	<.0001
comb*tiempo	<.0001
comb*Temp	<.0001
cepa*tiempo	<.0001
Temp*tiempo	<.0001
comb*cepa*Temp*tiemp	<.0001
Rep	0.3512
rep*cepa	0.8241
rep*comb	0.4951
rep*tiempo	0.2513
rep*Temp	0.0779

Anexo 8. Interacción de factores que tuvieron la mayor influencia en el comportamiento de la disminución de seis cepas de *Campylobacter* utilizando combinaciones de compuestos cítricos y Limonene a tres diferentes temperaturas (4 °C, 23 °C y 37 °C) a dos tiempos diferentes (0 y 24 horas).

Interacciones	P≤(0.05)
Comb	<.0001
Cepa	<.0001
Temp	<.0001
Tiempo	<.0001
comb*cepa	0.0005
comb*tiempo	<.0001
comb*Temp	<.0001
cepa*tiempo	<.0001
Temp*tiempo	<.0001
comb*cepa*Temp*tiemp	<.0001
Rep	0.3162
rep*cepa	0.5412
rep*comb	0.7045
rep*tiempo	0.5078
rep*Temp	0.497

Anexo 9. Interacción de factores que tuvieron la mayor influencia en el comportamiento de la disminución de seis cepas de *Campylobacter* utilizando combinaciones de compuestos cítricos y Limonene con coctel de tres bacteriófagos a tres diferentes temperaturas (4 °C, 23 °C y 37 °C) a dos tiempos diferentes (0 y 24 horas).

Interacciones	P≤(0.05)
Comb	<.0001
Cepa	<.0001
Temp	<.0001
Tiempo	<.0001
comb*cepa	<.0001
comb*tiempo	<.0001
comb*Temp	<.0001
cepa*tiempo	<.0001
Temp*tiempo	<.0001
comb*cepa*Temp*tiemp	<.0001
Rep	0.0022
rep*cepa	0.188
rep*comb	0.3127
rep*tiempo	0.7956
rep*Temp	0.1913

