



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

**FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y RESISTENCIA A
DESINFECTANTES EN CEPAS DE *SALMONELLA* AISLADAS
DE NOPAL VERDURA Y MUESTRAS DE AGUA Y SUELO DE
USO AGRÍCOLA**

ALFRICIA ADRIANA DE LOS SANTOS VILLAMIL

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

La presente tesis titulada: “**FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y RESISTENCIA A DESINFECTANTES EN CEPAS DE SALMONELLA AISLADAS DE NOPAL VERDURA Y MUESTRAS DE AGUA Y SUELO DE USO AGRÍCOLA**” realizada por la alumna Alfricia Adriana de los Santos Villamil, con la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

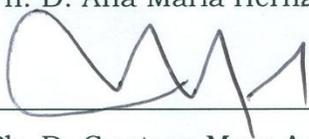
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



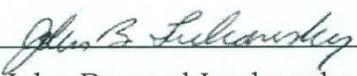
Ph. D. Ana María Hernández Anguiano

ASESOR:



Ph. D. Gustavo Mora Aguilera

ASESOR:



Ph. D. John Bernard Luchansky

ASESOR:



M.C. Carlos Alberto Eslava Campos

Montecillo Texcoco, Estado de México. Octubre de 2010

A G R A D E C E M I E N T O S

Al pueblo de México, que a través de CONACYT, me brido el apoyo económico para poder realizar estudios de posgrado.

A todos los maestros que han contribuido a lo largo de toda mi formación académica.

A la Dra. Ana María Hernández por su apoyo y orientación.

Al Dr. Carlos Eslava, por a verme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Gustavo Mora por enriquecer este trabajo con sus ideas.

A Paloma Salazar por su apoyo brindado durante la estancia en el laboratorio de la UNAM.

A mis amigos Alma Solano, Berenice Alonso, Marcos Ventura, Eduardo Molina y de manera especial a Petra Andrade, Patricia Landa y Alejandro Solís, por su apoyo moral y darme animo en los momentos más difíciles de la maestría, muchas gracias.

DEDICATORIA

Al Todopoderoso, Él que todo lo sabe, por guiarme y ayudarme en todos los momentos de mi vida, muchas gracias.

A mis padres por apoyarme y darme animo en todo momento.

Con todo mi amor a Rodrigo

Con mucho cariño a mis abuelitos Celia y Julio

A mi tío Julio.

*Es de sabios hablar poco y
de inteligentes mantener la calma.*

(Proverbios 17:27)

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. RESUMEN	1
II. MARCO TEORICO	3
2.1 Nopal	3
2.1.1 Origen	3
2.1.2 Importancia.....	3
2.1.3 Usos.....	4
2.1.4 Riesgos de contaminación.....	4
2.2. <i>Salmonella</i>	5
2.2.1. Taxonomía y descripción	5
2.2.2 Hábitat	6
2.3.3. Enfermedades causadas por <i>Salmonella</i>	6
2.2.4 Capacidad de <i>Salmonella</i> de formar biopelículas.....	7
2.3 Aspectos generales de las biopelículas	7
2.3.1 Definición y composición	7
2.3.2 Formación	7
2.3.3 Función.....	8
2.3.4 Problemas en los sectores: industrial, de salud y de alimentos.....	9
2.4. Formación y control de biopelículas.....	10
2.5 Objetivos e hipótesis.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Cepas.....	15
3.1.1 Reactivación de cepas	15

3.1.2 Verificación de pureza de cepas	16
3.2. Morfología de colonias y formación de matriz extracelular.....	17
3.3 Formación de biopelículas por cepas de <i>Salmonella</i>	18
3.3.1 Preparación de inóculo	18
3.3.2 Inoculación e incubación de placas.....	18
3.3.3 Tinción y lectura de densidad óptica.....	19
3.3.4 Repeticiones experimentales	20
3.4 Sensibilidad de biopelículas de <i>Salmonella</i> a desinfectantes orgánicos e inorgánicos.....	21
3.4.1 Desinfectantes orgánicos e inorgánicos	22
3.4.2 Tratamiento de biopelículas con desinfectantes	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Reactivación de cepas.....	24
4.2 Pureza de cepas	24
4.3 Formación de matriz extracelular por cepas de <i>Salmonella</i>	25
4.4 Formación de biopelículas	28
4.4 Sensibilidad de <i>Salmonella</i> productora de biopelículas a desinfectantes orgánicos e inorgánicos.....	35
V. CONCLUSIONES	39
VI. REFERENCIAS	40
CUADROS.....	48
FIGURAS.....	63
ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Relación de cepas de *Salmonella* analizadas en este estudio..... 16
- Cuadro 2.** Valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%), registrados en el primer ensayo. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones. Las letras indican el sobrenadante de cepas aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006. 49
- Cuadro 3.** Valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%), registrados en el segundo ensayo. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las letras indican el sobrenadante de cepas aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006. 50
- Cuadro 4.** Clasificación de cepas de *Salmonella* aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006. Las cepas se clasificaron en las categorías de no productora y productora débil, moderada o fuerte de biopelículas, de acuerdo a los valores de absorbancia registrados en sobrenadantes en etanol (96%). Estos resultados corresponden al primer ensayo..... 51
- Cuadro 5.** Clasificación de cepas de *Salmonella* aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006. Las cepas se clasificaron en las categorías de no productora y productora débil, moderada o fuerte de biopelículas, de acuerdo a los valores de absorbancia registrados en sobrenadantes en etanol (96%). Estos resultados corresponden al segundo ensayo. 52

Cuadro 6. Clasificación de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006. Las cepas se clasificaron en las categorías de no productora y productora débil, moderada o fuerte de biopelículas, de acuerdo a los valores de absorbancia registrados en sobrenadantes en etanol (96%). Estos resultados corresponden a los promedios obtenidos del primer y segundo ensayo.	53
Cuadro 7. Efecto de desinfectantes orgánicos e inorgánicos, disueltos en agua destilada estéril, en la viabilidad de células de <i>Salmonella</i> , desarrolladas en biopelículas formadas en placas de poliestireno por 48 h e incubadas a 37 °C.	54
Cuadro 8. Efecto de desinfectantes orgánicos e inorgánicos, disueltos en MEM (Medio Esencial Mínimo), en la viabilidad de células de <i>Salmonella</i> , desarrolladas en biopelículas formadas en placas de poliestireno por 48 h e incubadas a 37 °C.....	54
Cuadro 9. Análisis de varianza de los valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de <i>Salmonella</i> en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos en el primer ensayo.	55
Cuadro 10. Análisis de comparación de los valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de <i>Salmonella</i> en etanol (96%) en el primer ensayo según Tukey ($\alpha=0.05$).....	56
Cuadro 11. Análisis de comparación de medias con respecto al tiempo, de los valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de <i>Salmonella</i> en etanol (96%), según Tukey ($\alpha=0.05$).	57
Cuadro 12. Análisis de varianza de los valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de <i>Salmonella</i> en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos en el segundo ensayo.	58
Cuadro 13. Análisis de comparación de medias de las cepas, de los valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de <i>Salmonella</i> en etanol (96%) en el segundo ensayo según Tukey ($\alpha=0.05$).	59

Cuadro 14. Análisis general de comparación de medias con respecto al tiempo de los valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de <i>Salmonella</i> en etanol (96%) registrados en el segundo ensayo según Tukey ($\alpha = 0.05$).	60
Cuadro 15. Análisis de varianza del efecto de los desinfectantes orgánicos e inorgánicos, en la viabilidad de células de <i>Salmonella</i> , desarrolladas en biopelículas formadas en placas de poliestireno por 48 h e incubadas a 37 °C	61
Cuadro 16. Análisis general de comparación de medias, con respecto a tratamientos de los desinfectantes sobre biopelículas de cepas de <i>Salmonella</i> . de 48 h e incubadas a 37 °C (Tukey, $\alpha = 0.05$).	62

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Colonias de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O44:H18, crecidas en tres diferentes medios de cultivo. A) Cepas de *Samonella* en Agar sangre. B) Cepas de *E. coli* y *Salmonella* en Agar MacConkey y C) Cepas de *Salmonella* en Agar soya tripticaseína incubada a 37 °C por 24 h..... 25
- Figura 2.** Morfología de colonias de *Salmonella* sp, aisladas de nopal, agua y suelo de uso agrícola, en AST e incubadas a 37 °C por 24 h, y posteriormente a temperatura ambiente por 38 días. Donde: S1, S4, N4, N7, N8, N10, N14 y A3 cepas con colonias planas sin microcanales; y, S8, N3, N12, N13, N17, N18 cepas con colonias con crecimiento tipo microcanal indicado con flecha roja. 27
- Figura 3.** Valores promedio de absorbancia de los tres tiempos, relacionados con la capacidad de producir biopelículas, registrados en el primer y segundo ensayo. Las letras A, S y N indican el sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%), aisladas de agua, suelo y nopal, respectivamente; CN: pozo solo con MEM; T-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12; T+: *E. coli* O44:H18. 29
- Figura 4.** Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos en el primer ensayo. Las letras A, S y N indican el sobrenadante de cepas aisladas de agua, suelo y nopal, respectivamente. Las barras representan la desviación estándar..... 31
- Figura 5.** Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos en el segundo ensayo. Las letras A, S y N indican el sobrenadante de cepas aisladas de agua, suelo y nopal, respectivamente; y T-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12; T+: *E. coli* O44:H18. Las barras representan la desviación estándar..... 32

- Figura 6.** Comparacion de efecto de desinfectantes orgánicos e inorgánicos diluidos con agua y MEM, en la viabilidad de biopelículas de *Salmonella* de 48 h de crecimiento, en placas de poliestireno incubadas a 37 °C. Donde: T-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I:1,2 y T+: *E. coli*, representan a los controles negativo y positivo, respectivamente; y, A8, S1 y N18, a cepas aisladas de agua, suelo y nopal, respectivamente..... 36
- Figura 7.** Etapas en la preparación del medio Agar Sangre (AS). A) Enfriamiento del Agar Base de Sangre (ABS) después de autoclaveado en baño María a 45°C. B) Adición de sangre de carnero al medio ABS. C) Homogeneización de AS por agitación hasta que todo el medio se encuentre rojo. D) Vaciado de AS en cajas Petri estériles..... 64
- Figura 8.** Preparación de Medio Esencial Mínimo (MEM). A) Vaciado del MEM en agua desionizada estéril. B) Adición de glutamina, bicarbonato y HEPES con pipeta nueva y estéril. C) Vaciado del medio al filtro Stericup®. D) Filtrado del medio usando una bomba de vacío..... 65
- Figura 9.** Esterilización de glucosa para el MEM. A) Vaciado de la glucosa diluida en agua en una jeringa para su filtración. B) Filtrado de la glucosa al 4% a través de un filtro MILLEX® de 0.22 µm desechable. 66
- Figura 10.** Preparación de placas poliestireno (Coster®) para la evaluación de biopelículas. A) Adición del medio esencial mínimo (MEM) con glucosa al 0.4% a los pozos de las placa. B) Inoculación de las placas con cepas de *Salmonella* sp. C) Placas de poliestireno inoculadas e incubadas a 37 °C por 72 h. D) Lavado de placas, después de ser teñidas con cristal violeta al 1%. 67
- Figura 11.** Suspensión de colorante en etanol (96%) a las celdas del espectrofotómetro Spectronic® (Genesys 2)..... 68

- Figura 13.** Preparación de tarjetas para corroborar la identidad de las cepas, en el sistema Vitek (Biomerieux®, Francia). A) Gradillas de Vitek®, con tarjetas y tubos de suspensión bacteriana. B) Vitek® para el llenado de las tarjetas con la suspensión bacteriana. C) Corte del conducto para separar la tarjeta. D) Introducción de tarjetas al equipo automatizado Vitek® para su análisis. 69
- Figura 14.** Etapas de la siembra en placa por la técnica de gota. A) Plantilla para la siembra en caja de Petri por la técnica de gota. B) Acomodo de la plantilla por debajo de la caja Petri con AST. C) Deposición del inóculo sobre el are definida de la placa. D) Secado de las cajas inoculadas sobre una superficie nivelada en condiciones de asepsia..... 70
- Figura 15.** Primer ensayo, repetición uno. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos. 71
- Figura 16.** Primer ensayo, repetición dos. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos. 71
- Figura 17.** Primer ensayo, repetición tres. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos. 72
- Figura 18.** Segundo ensayo, repetición uno. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos..... 72
- Figura 19.** Segundo ensayo, repetición dos. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos..... 73
- Figura 20.** Segundo ensayo, repetición tres. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos..... 73
- Figura 21.** Segundo ensayo, repetición cuatro. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos..... 74

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y RESISTENCIA A DESINFECTANTES EN CEPAS DE *SALMONELLA* AISLADAS DE NOPAL VERDURA Y MUESTRAS DE AGUA Y SUELO DE USO AGRÍCOLA

Alfricia Adriana De los Santos Villamil, M.C
Colegio de Postgraduados, 2010

La presencia de *Salmonella* en nopal verdura fresco (*Opuntia ficus-indica* L.) MILL se ha documentado recientemente (Hernández *et al.*, 2009). La contaminación de alimentos es un problema de salud pública que afecta a las personas en todo el mundo. Una característica importante de *Salmonella* es su capacidad para formar biopelículas, las cuales son comunidades de células microbianas embebidas en una matriz de exopolímeros que ellas mismas producen en respuesta a factores como la temperatura, la humedad relativa y la composición del medio en que se encuentran (Annous *et al.*, 2005; Stepanovic *et al.*, 2000). Esta capacidad le permite a *Salmonella* adherirse de manera irreversible y de colonizar superficies bióticas y abióticas (Annous *et al.*, 2005, Stepanovic *et al.*, 2004) así como la de resistir tratamientos con antimicrobianos (antibióticos, desinfectantes y germinicidas) (Annous *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2001).

Las biopelículas formadas por *Salmonella* pueden convertirse en focos importantes de contaminación en la producción de alimentos inocuos, difíciles de remover durante los procedimientos normales de limpieza. Por lo anterior los objetivos del estudio fueron 1) determinar la capacidad de cepas de *Salmonella*, aisladas de nopal verdura (10 cepas), muestras de agua (2 cepas) y suelo (3 cepas), para formar biopelículas y 2) evaluar el efecto bactericida de los desinfectantes ácido cítrico, ácido láctico e hipoclorito de sodio en la viabilidad de cepas formadoras de biopelículas. Se utilizó el método de O'Toole y Kolter (1998) y placas de poliestireno (Coster®) con medio esencial mínimo con glucosa (MEM) y se determinó la densidad óptica (D.O) para determinar la producción de biopelículas. Los desinfectantes se aplicaron a placas con formación de biopelículas en MEM simple de 48 h a 37°C. Todas las cepas registraron producción de biopelículas desde las 24 h aunque se obtuvieron diferencias (Tukey $\alpha=0.05$), dependiendo del tiempo de incubación con respecto a los valores de D.O. Las cepas de suelo expresaron su capacidad más rápidamente que las de agua y nopal. El hipoclorito de sodio (200 ppm) y el ácido láctico (1.5×10^{-4}) inhibieron el crecimiento de células cuando se aplicaron por 20 min sobre las biopelículas. Los resultados aquí obtenidos evidencian la importancia de la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas en la producción de nopal como estrategia para prevenir la contaminación por cepas de *Salmonella* formadoras de biopelículas *in vivo* donde el efecto de los tratamientos con satizantes pudiera variar.

Palabras clave: Biopelículas, Desinfectantes, Nopal, *Salmonella*.

BIOFILM FORMATION AND DISINFECTANT RESISTANCE IN SALMONELLA STRAINS ISOLATED FROM FRESH NOPAL AND WATER AND SOIL SAMPLES FOR AGRICULTURAL USES

Alfricia Adriana De los Santos Villamil, M.C
Colegio de Postgraduados, 2010

The presence of *Salmonella* in fresh nopal (*Opuntia ficus-indica* L.) MILL has been recently documented (Hernández *et al.*, 2009). Food contamination is a public health problem that affects people worldwide. An important characteristic of *Salmonella* is its capability of forming biofilms, which are communities of microbial cells embedded in an exopolymer matrix they themselves produce in response to factors such as temperature, relative humidity and the composition of the environment they are found in (1, 6). This capability helps *Salmonella* adhere irreversibly and colonize biotic and abiotic surfaces (Annous *et al.*, 2005; Stepanovic *et al.*, 2000) as well as resisting treatments with antimicrobials (antibiotics, disinfectant and germicides) (Annous *et al.*, 2005, Stepanovic *et al.*, 2004).

The biofilms formed by *Salmonella* can become important sources of pollution in food production, difficult to remove during normal cleaning procedures. Because of this, the goals of this study were 1) to determine the ability of *Salmonella* strains, isolated from nopal (10 strains), water samples (2 strains), and soil (3 strains) to form biofilms, and 2) to evaluate the bactericidal effect of the disinfectants citric acid, lactic acid, and sodium hypochlorite on the viability of biofilm producing strains. The O'toole and Kolter (1998) method was used with polystyrene plates (Coster™) and a minimum essential medium (MEM). The optic density (OD) was determined to determine biofilm production. The disinfectants were applied to the plates with a formation of biofilm in a simple MEM at 48h, at 37 °C. All the strains showed biofilm production at 24 h, although there were differences (Tukey $\alpha=0.05$) depending on the incubation time with regard to OD values. The strains from the soil showed biofilm faster than did those from nopal or water. Sodium hypochlorite (200 ppm) and lactic acid (1.5×10^{-4}) inhibited cell growth when applied for 20 min on the biofilms. The results obtained point out the importance of implementing Good Agricultural Practices in the production of nopal as a strategy to prevent contamination by *Salmonella* strains that produce biofilms *in vivo*, where the effect of treatments with sanitizers may vary.

Key Words: Biofilms, Disinfectants, Nopal, *Salmonella*

II. MARCO TEORICO

2.1 Nopal

2.1.1 Origen

El nopal, llamado por los aztecas “nochtli o nopalli”, es una planta endémica del continente americano, perteneciente a los géneros *Opuntia* y *Nopalea* de la familia *Cactaceae*. En México se encuentran alrededor de 104 especies de *Opuntia* y 10 de *Nopalea*, muchas de las cuales fueron domesticadas por los indígenas y llevadas por los conquistadores a Sudamérica y al resto del mundo (Corrales, 2000).

2.1.2 Importancia

El cultivo del nopal tiene importancia económica, social y agroecológica para los pueblos de diversos países. Esto por la gran superficie ocupada por las nopaleras (tanto silvestres como cultivadas). En México, el nopal (*Opuntia ficus-indica*) ocupa una superficie promedio a nivel nacional de 9,318 hectáreas (ha), concentradas en el Distrito Federal (7,500 ha), y en los estados de Morelos (450 ha), Puebla (400 ha), Michoacan (318 ha), Guanajuato (280 ha), Baja California (150 ha), Jalisco (120 ha) y Oaxaca (100 ha) (Agronet, Julio 2010). Así como por el tipo y número de productores involucrados en el cultivo, por la diversidad de regiones en las que se cultiva y productos generados y por su importancia en la conservación del suelo (ASERCA, 1999; Granados, 1991).

2.1.3 Usos

Las especies del nopal se utilizan para múltiples usos con diversos propósitos (Claridades Agropecuarias, 1998). Como agregado en la construcción donde sirven como aglutinante para la protección de muros, techos de adobe y pinturas; como sustrato, en la producción de grana cochinilla; como forraje, para la alimentación de ganado en zonas áridas; como materia prima, para la producción de suplementos alimenticios, cosméticos y elaboración de bebidas alcohólicas (Corrales, 2000). Sin embargo, el principal uso del nopal es para consumo en fresco o procesado (ensaladas y yogurts) o como planta medicinal (Medellín *et al*, 1998). En este último caso, a la planta de nopal se le han atribuido propiedades para el control de hipoglucemias (Garibay, 2006), para disminuir triglicéridos en la sangre (García *et al*, 2006) y para el control de trastornos gastrointestinales, por su alto contenido en fibra. Por todo lo anterior al nopal se le considera un alimento funcional ya que aparte de su valor nutritivo aporta un beneficio a la salud al prevenir enfermedades (FAO, 2004), y un “tesoro bajo las espinas” por los recursos económicos que genera su cultivo (FAO, 2006).

2.1.4 Riesgos de contaminación

Como muchos otros productos hortofrutícolas, el cultivo del nopal está expuesto a contaminación por diversos microorganismos debido a las condiciones generadas durante su producción y manejo postcosecha (Annous, 2009). En el caso del nopal se cosecha de manera manual con ayuda de un cuchillo y guantes, una vez cortados los nopalitas se depositan en canastos y/o

cajas, y son transportados en camionetas a la central de abastos o directamente a los mercados locales; sin ningún tipo de acondicionamiento (Flores, *et al.*, 1995). Estas condiciones de manejo hacen que patógenos entéricos como *Salmonella* puedan llegar a contaminar este producto hortofrutícola, especialmente cuando se utilizan aguas contaminadas o negras, se incorporan abonos orgánicos al suelo durante su producción o manejo postcosecha (Hernández *et al.*, 2009) y cuando se maneja el producto con las manos con poca higiene (Kroupitski *et al.*, 2008).

2.2. *Salmonella*

2.2.1. Taxonomía y descripción

El nombre de *Salmonella* fue dado en 1900 por Lignieres en honor a D. E. Salmon, bacteriólogo americano quien describió por primera vez a esta bacteria, inicialmente denominada *Cholerae suis* (Torres, 2002).

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. En los últimos años se ha venido modificado la nomenclatura de *Salmonella*, en la actualidad se consideran dos especies *Salmonella entérica*, que incluye seis subespecies y *Salmonella bongori* (Tellez *et al.*, 2004). Cada subespecie contiene a su vez varias serovariedades (serotipos) definidas por ejemplo "*Salmonella enterica* subespecie *entérica* serotipo Typhimurium", pero para fines prácticos es habitual que en la comunicación científica, las serovariedades se traten artificialmente como especies, lo cual evita nombres demasiado largos, entonces el nombre queda solo como "*Salmonella typhimurium*" (Uribe y Suarez, 2006).

Las dos especies de *Salmonella* engloban más de 2,700 serotipos todos considerados patógenos al hombre. Las células tienen forma de bacilo, cuyo tamaño oscila entre 0.7-1.5 x 2.0-5 mm de longitud (Bell y Kyriakides, 2002) y generalmente poseen flagelos peritricos que les dan movilidad. Es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa que fermenta la glucosa, produce ácido y gas, y es capaz de descarboxilizar algún aminoácido pero no produce ureasa. Las células crecen entre 8° y 45° C de temperatura; y 4.1 y 9.0 de pH con actividad de agua (a_w) mínima de aproximadamente 0.94 (Hanes, 2003).

2.2.2 Hábitat

El tracto intestinal de animales de sangre caliente y fría es el hábitat natural de *Salmonella* (Téllez *et al.*, 2004). Sin embargo, la bacteria se ha encontrado en agua, en productos de origen animal como carne, huevo y leche (Torres, 2002), así como también en productos hortofrutícolas frescos (Hernández *et al.*, 2009). Lo anterior aunado al grado variable de adaptación a hospedantes guarda estrecha relación con el daño que causan en el hombre (Maurer, 2005).

2.3.3. Enfermedades causadas por *Salmonella*

Desde hace más de 100 años se sabe de la capacidad de *Salmonella* de ocasionar enfermedades en el hombre como la fiebre tifoidea, la gastroenteritis y la salmonelosis. La salmonelosis es una de las principales causas de muerte asociadas al consumo de alimentos contaminados, tanto en países desarrollados como subdesarrollados (Bell y Kyriakides, 2002; Torres, 2002). Aproximadamente una tercera parte de los alimentos implicados en brotes por salmonelosis son productos cárnicos, productos derivados de aves (huevos y

ovoproductos), leche y derivados (Hanes, 2003); sin embargo, las frutas y hortalizas frescas como manzana, tomate cilantro, melón, perejil, chiles jalapeños y chiles serranos, también se han reportado implicadas en las últimas décadas (Annous, 2009; Lapidot *et al.*, 2006).

2.2.4 Capacidad de Salmonella de formar biopelículas

Una característica importante de *Salmonella* es su capacidad para formar biopelículas. Por ejemplo *Salmonella entérica* serotipo Thompson, forma biopelículas en la planta de cilantro (Annous, 2009), y *Salmonella* sp en melón Cantalupe (Annous *et al.*, 2005). Para ilustrar la importancia de esta característica en la bacteria se proporciona información general sobre las biopelículas a continuación.

2.3 Aspectos generales de las biopelículas

2.3.1 Definición y composición

Las biopelículas son comunidades de células microbianas embebidas en una matriz de exopolímeros que ellas mismas producen como mecanismo de supervivencia y protección (Branda *et al.*, 2005). La composición de esta matriz es variable. Puede estar formada de carbohidratos, péptidos, proteínas, lípidos o una combinación de estas sustancias aunque la mayor parte del volumen la constituye el agua, la cual representa hasta un 90 % del contenido total (Costerton y Rodney, 2002; Lasa, 2006; Edstrom sin año).

2.3.2 Formación

La formación de biopelículas por microorganismos se produce en respuesta a diversos factores como la temperatura, la humedad relativa, la composición del medio y las condiciones de aerobiosis/anaerobiosis del medio (Edstrom sin año; McLandsborough *et al.*, 2006). Es un proceso dinámico caracterizado por presentar diferentes etapas como: la de adhesión (reversible e irreversible) entre la superficie y las células; la de formación de limo y de microcolonias, en la cual se atrapan y concentran nutrientes y oxígeno, y las células producen exopolisacaridos adicionales para el anclaje de células superficiales y la estabilidad de la colonia; la llegada de colonizadores secundarios, los cuales metabolizan los desechos de la colonia; y la de liberación de células, a partir de las capas externas de crecimiento para ser transportadas a sitios diferentes donde se inicie la formación de nuevas biopelículas (Edstrom sin año; Dunne, 2008). Con relación en la última etapa, se ha reportado (Allison, 1998) que las biopelículas pueden autodegradarse debido a una reducción en la concentración de oxígeno o del contenido de nutrientes por el incremento de la biomasa.

2.3.3 Función

La capacidad de formar biopelículas permite a los microorganismos como *Salmonella* adherirse y colonizar superficies bióticas y abióticas como tejido vegetal y animal, plástico, cemento y acero (Annous *et al.*, 2005; Vanegas *et al.*; 2009; Hood and Zottola, 1997). Diversas fuerzas están involucradas en la adhesión de las células a las superficies entre las que se encuentran fuerzas débiles de Vander Walls, electrostáticas e hidrofobias y fuerzas fuertes como

las iónicas y covalentes (McLandsborough *et al.*, 2006; Kumar y Anand, 1998). Las biopelículas también permiten a los microorganismos resistir tratamientos con antimicrobianos (antibióticos, desinfectantes y germicidas). Lo anterior debido a su estructura tridimensional y a su matriz de ex polímeros, las cuales funcionan como tamiz molecular y barreras de difusión, respectivamente (Kumar y Anand, 1998).

2.3.4 Problemas en los sectores: industrial, de salud y de alimentos

La formación de biopelículas por microorganismos representa un serio problema para los sectores industrial, de salud y de la producción de alimentos. Esto por que causan corrosión de tuberías metálicas de agua y petróleo, especialmente las producidas por bacterias sulfato reductoras o productoras de ácido (Hamilton, 1998). También porque se les ha asociado con diversos problemas de salud como fuentes de infecciones en hospitales (nosocomios) cuyo costo anual asciende a más de 1 billón de dólares anuales (Mah y O'Toole, 2001). Cabe señalar que las biopelículas pueden resistir los mecanismos de defensa del sistema inmune del paciente y ser extremadamente resistentes a tratamientos con antibióticos y tratamientos con biosidas para la desinfección de instrumental quirúrgico (Hancock y Klemm, 2006). En procesos de transformación de alimentos, las biopelículas pueden constituirse en importantes focos de contaminación por bacterias patógenas, tales como *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas Campylobacter*, *E.coli* y *Listeria*, (Joseph *et al.*, 2001), ya que son difíciles de remover de las superficies de contacto

durante los procedimientos normales de limpieza y sanitación, (Annous, 2009; Joseph *et al.*, 2001; Kumar y Anand, 1998).

Varios investigadores coinciden en que el proceso de formación de biopelículas está bajo el control de un complejo sistema de regulación genético entre los que se encuentra el llamado “*quorum sensing*”. Este sistema de regulación se activa en respuesta a la densidad de población celular y está mediado por la producción y secreción de moléculas indicadoras (“signal molecules”). Una vez que estas moléculas alcanzan cierto umbral, inducen diferentes procesos celulares entre los que se encuentran, además de la formación de biopelículas, la movilidad, conjugación, competencia, esporulación y virulencia (Dunne, 2006; Fuqua *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 2001). Por otra parte, también se han reportado los reguladores globales CsrA en *E. coli*, CytR en *Vibrio cholerae* y SarA en *Staphylococcus aureus*, los cuales son fundamentales para la formación de biopelículas por estas bacterias (Toledo-Arana *et al.*, 2005).

2.4. Formación y control de biopelículas

Para evaluar la formación de biopelículas existen diferentes métodos como la microscopia la cual puede ser electrónica de transmisión o de barrido o la microscopia epifluorescente (Kuman y Anand, 1998). Sin embargo, la formación también se puede determinar visual o espectrofotométricamente (Christensen *et al.*, 1985). En el primer caso, se deja crecer una bacteria en un tubo de cultivo para favorecer la formación de biopelícula, la cual se tiñe y de manera visual se valora en función a una escala. En el segundo caso, la bacteria se crece en microplacas donde la valoración de la biopelícula se realiza

siguiendo los pasos siguientes: fijación de biopelícula con alcohol; tinción de células con cristal violeta; lavado con agua para retirar las células plantónicas; suspensión en ácido acético glacial; y, determinación de la densidad óptica de la biopelícula en un espectrofómetro (Stepanovic, 2004).

El control de biopelículas representa un reto para los sectores industrial, de la salud y de la producción de alimentos, debido a la dificultad para eliminarlas una vez formadas. Entre los métodos de control se encuentran los físicos, químicos y biológicos, los cuales se describen a continuación.

Métodos físicos. Entre estos se encuentran el uso de campos magnéticos y eléctricos, la sonicación combinada con la aplicación de ácidos orgánicos o calor (Hyoungill *et al.*, 2009; Quian *et al.*, 1997). También las corrientes eléctricas combinadas con el uso de antibióticos han mostrado buenos resultados en el control de biopelículas formadas por *Escherichia coli* O157:H7 (Liu *et al.*, 1997); y los tratamientos térmicos con agua para mantener las características sensoriales y la vida útil de una gran variedad de frutas y hortalizas frescas (Annous, 2009). La radiación ionizante y la luz UV se han reportado reducen tanto las células planctónicas como las poblaciones de las biopelículas producidas por *Salmonella* (Brendan *et al.*, 2004).

Métodos químicos.- Estos incluyen la utilización de desinfectantes, antibióticos, detergentes, agentes quelantes o sus combinaciones entre otros. Sin embargo, para que estos productos puedan funcionar se recomienda desprender o liberar, de la superficie, el mayor número de células como sea posible, ya que estas son mucho más sensibles a los desinfectantes, así como romper la matriz

de polisacáridos para un mejor contacto con la biopelícula, previo al tratamiento. Por ejemplo, Korber (1997) reportó que el tratamiento con fosfato trisódico al 10% solamente tiene efecto en la reducción del número de células bacterianas embebidas en biopelículas. Por otra parte, Kumar (1998) menciona que los desinfectantes como el ácido peristáltico, formaldehído y cloruro de mercurio no tienen efecto sobre las biopelículas formadas por *Listeria monocytogenes* en superficies de contacto con alimentos. También se ha reportado que algunos compuestos bioactivos como las bacteriocinas pueden controlar la formación de biopelículas. Al respecto, Bower *et al.* (1995) reportaron que la nisina inhibió la formación de biopelículas producidas por *Listeria monocytogenes*.

Costerton y Rodney (2002) reportan que para que el desinfectante también tenga efecto sobre las células éste debe reaccionar primero con los polisacáridos de la biopelícula; sin embargo, el desinfectante puede oxidarse al entrar en contacto con estos compuestos y perder su efectividad (Edstrom, sin año). Otros reportan (Kumar *et al.*, 1998) que después de un tratamiento con biocida las células bacterianas pueden incrementar la producción de exopolímeros como respuesta de defensa y dejar sin efectividad al producto.

Una nueva alternativa es el uso de compuestos antimicrobianos en el tratamiento de embalaje de alimentos para evitar la formación de biopelículas. Sin embargo, Kumar y Anand (1998), reportan que las células bacterianas pueden generar resistencia debido a la producción de enzimas que degradan e

inactivan a los antimicrobianos, especialmente a los del grupo de los β -lactámicos.

Por lo anteriormente expuesto, se deduce que los tratamientos químicos son eficaces en la eliminación de células planctónicas pero ineficaces contra las biopelículas por lo que una combinación de métodos físicos y químicos aunados a la prevención de la formación de estas estructuras es lo más conveniente para evitar problemas de contaminación (Brendan *et al.*, 2004).

Control biológico.- En la literatura se cuenta con reportes sobre la utilización de fagos en el control de biopelículas. Por ejemplo, Hughes *et al.* (1998b) reportaron que algunos fagos como el SF153b pueden despolimerizar los exopolisacáridos producidos por bacterias Gram negativas, por lo que podrían ser utilizados de manera selectiva en la degradación de biopelículas.

La prevención de la formación de biopelículas producidas por microorganismos a través de acciones como la limpieza y sanitación de superficies se constituye como una de las mejores estrategias en la prevención de la contaminación por patógenos al hombre de los productos hortofrutícolas frescos. Por lo que el diseño de equipos de procesamiento de fácil limpieza y sanitación es crucial en estas acciones (Kumar y Anand, 1998).

Durante un análisis de la pureza de una colección de cepas de *Salmonella*, previamente aisladas de nopal verdura y de muestras de agua y de suelo de uso agrícola, se observó la presencia de colonias “rugosas” en cultivos de más de 30 días de crecimiento en Agar Soya Tripticaseina a temperatura ambiente.

Cabe señalar que la “rugosidad” puede ser una característica indicadora de formación de biopelículas (Malcova *et al.*, 2007).

2.5 Objetivos e hipótesis

Por todo lo anterior los objetivos de este estudio fueron determinar la capacidad de cepas de *Salmonella* aisladas de nopal verdura fresco y muestras de agua y suelo de uso agrícola proveniente de la región nopalera de Tlalnepantla Mor., para formar biopelículas y evaluar el efecto bactericida de los desinfectantes ácido cítrico, ácido láctico e hipoclorito de sodio en la viabilidad de cepas formadoras de biopelículas con fines de prevención y control.

Las hipótesis plateadas para este trabajo son: las cepas aisladas de nopal verdura, agua y suelo agrícola pueden formar biopelículas y; la aplicación de un desinfectante afecta la viabilidad de las células formadoras de biopelículas, inhibiendo el crecimiento de las mismas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas

Se incluyeron en este estudio 15 cepas de *Salmonella*, correspondientes a *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium (*S. typhimurium*), *Salmonella entérica* serotipo Javiana (*S. javiana*), y *Salmonella* sp. aisladas e identificadas previamente (Hernández *et. al.*, 2009) (Cuadro1). Diez cepas se aislaron de nopal verdura (N), dos de agua (A) y tres de suelo de uso agrícola (S), de una zona productora de nopal en Tlalnepantla, Morelos, México, en verano de 2006 (Hernández, *et. al.*, 2009).

Para los ensayos de biopelículas se utilizaron como testigo las cepas de *Escherichia coli* O44:H18 y *S. typhimurium* Copenhague 4,12:I 12, de una colección del Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

3.1.1 Reactivación de cepas

Las cepas de *Salmonella* se recuperaron del medio de conservación agua-glicerol (50:50) y de condiciones a -80 °C. Para su reactivación se transfirieron a tubos (20 x 150 mm) con 5 ml de Caldo Soya Tripticaseína (CST Bioxon®), e incubaron a 37 °C por 18 h. Las suspensiones bacterianas obtenidas se sembraron en cajas Petri (90 x 15 mm) con Agar Entérico Hektoen (AEH Bioxon®), por la técnica de estría abierta, e incubaron a 37 °C por 48 h. Cada una de las cepas se transfirió a tubos inclinados con rosca (8 x 120 mm) con

Agar Soya Trypticaseina (AST Difco®) y se creció a 37 °C por 24 h. Los tubos con las cepas reactivadas se guardaron como tubos de trabajo.

Cuadro 1. Relación de cepas de *Salmonella* analizadas en este estudio.

Fuente	Clave	Especies de <i>Salmonella</i>
Nopal verdura	N3	<i>Salmonella sp.</i>
	N4	<i>S. javiana</i>
	N7	<i>S. typhimurium</i>
	N8	<i>S. javiana</i>
	N10	<i>S. javiana</i>
	N12	<i>S. typhimurium</i>
	N13	<i>S. typhimurium</i>
	N14	<i>S. javiana</i>
	N17	<i>S. typhimurium</i>
Agua	N18	<i>S. typhimurium</i>
	A3	<i>S. typhimurium</i>
Suelo	A8	<i>S. typhimurium</i>
	S1	<i>S. javiana</i>
	S4	<i>S. javiana</i>
	S8	<i>S. javiana</i>

Fuente: Hernández *et. al.*, 2009

3.1.2 Verificación de pureza de cepas

Las 15 cepas de *Salmonella* se crecieron en Agar Sangre (AS) a 37 °C por 24 h para verificar su pureza además de probar el tipo de hemólisis. La prueba de hemólisis consiste en detectar la presencia o ausencia de la enzima hemolisina a través de un cambio de color (lisis de eritrocitos) en el medio. En esta prueba se registran tres tipos de hemólisis: alfa, beta o gama. La hemólisis alfa

presenta una zona de glóbulos rojos parcialmente lisados que rodean a la colonia la cual es visible; y el medio, originalmente rojo intenso, cambia a verde tenue, con tendencia a café. La hemólisis beta exhibe una zona totalmente incolora alrededor de la colonia, la cual se aprecia por la pérdida de color, de rojo intenso pasa a rojo claro transparente. La hemólisis gama se distingue por la ausencia de lisis de eritrocitos y por mantener el color rojo intenso del medio (Koneman, 1985).

A partir de cultivos en AS, se seleccionaron colonias separadas y se transfirieron a los medios: Agar MacConkey (MC Bioxon®), para confirmar la reacción negativa de las cepas de *Salmonella* a la lactosa; y AST, para analizar visualmente la pureza de las cepas de las colonias desarrolladas a 37 °C por 24 h (Koneman, 1985; NOM-114-SSA1-1994) (Anexos). De los cultivos en AST se seleccionaron tres colonias por cepa con las características típicas de *Salmonella* y se transfirieron por separado a AST en tubo inclinado (8 x 120 mm) con rosca; dos tubos por colonia. Los cultivos así obtenidos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su utilización para las pruebas de formación de biopelículas y resistencia a desinfectantes.

Previo a su utilización, la identidad de los cultivos se corroboró por el método automatizado Vitek (Biomerieux, Francia) (Figura 13).

3.2. Morfología de colonias y formación de matriz extracelular

Las 15 cepas de *Salmonella* se sembraron individualmente en cajas con AST, se incubaron a 37 °C por 24 h y posteriormente a temperatura ambiente por 38 días. Durante ese tiempo se hicieron observaciones visuales periódicamente y

se registraron los cambios en los cultivos, en especial la aparición de colonias “rugosas” (con microcanales), característica previamente observada en tubos con AST inclinado durante la conservación y verificación de pureza de las cepas de *Salmonella*.

3.3 Formación de biopelículas por cepas de *Salmonella*

La formación de biopelículas se analizó por el método de O’Toole y Kolter (1998), con algunas modificaciones.

3.3.1 Preparación de inóculo

A partir de cultivos en tubo inclinado con AST se tomó, por separado, masa bacteriana la cual se transfirió a cajas Petri con AST y se incubó a 37°C por 24 h. De las colonias individuales desarrolladas se tomaron muestras para preparar suspensiones en solución salina estéril a 0.85 %, hasta ajustar la densidad bacteriana a uno en la escala de McFarland (3×10^8 UFC/mL) (Anexos)

3.3.2 Inoculación e incubación de placas

Se emplearon dos placas de poliestireno (Coster®) con 24 pozos cada una. En cada pozo se depositó 1 mL de Medio Esencial Mínimo (MEM simple) (Gibco®) suplementado con glucosa (Figura 10A). En seguida se depositaron 50 µL de suspensión bacteriana ajustada a 10^8 UFC/mL en solución salina al 0.85 % por pozo (Stepanović, 2000) (Figura 10B). Como control negativo se contó con 2 pozos que contenían únicamente MEM; y como testigo positivo (biopelícula positiva) y testigo negativo (biopelícula negativa), pozos inoculados con

suspensión de cepas de *E. coli* y de *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12, respectivamente. Se analizó por duplicado de acuerdo al esquema siguiente.

Placa I							Placa II						
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
A	CN	T-	T+	A3	A8	S1	A	CN	N7	N8	N10	N12	N13
B	CN	T-	T+	A3	A8	S1	B	CN	N7	N8	N10	N12	N13
C	S4	S8	N3	N4			C	N14	N17	N18			
D	S4	S8	N3	N4			D	N14	N17	N18			

Dónde: CN= Control negativo (MEM simple, sin bacteria); T-=Testigo negativo (*S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12); T+= Testigo positivo (*E. coli*); N cepa de nopal; A cepa de agua; y, S, cepa de suelo.

Las placas inoculadas se incubaron aeróbicamente a 37 °C por 24, 48 y 72 h sin agitación en oscuridad (Figura 10C). Transcurrida la incubación, se descartó el contenido de las placas y los pozos se lavaron enérgicamente tres veces con agua destilada estéril. Después del lavado, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente de laboratorio.

3.3.3 Tinción y lectura de densidad óptica

Para visualizar y definir la intensidad de la formación de biopelículas, en cada pozo de la placa se depositaron 950 µL de colorante cristal violeta (SIGMA-ALDRICH) al 1 % en agua destilada y se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente de laboratorio. Posteriormente se retiró el colorante con una pipeta Pasteur y se lavó con agua destilada estéril (Figura 10D). Después de dos lavados adicionales, se depositaron 1000 µL de etanol al 96%, por pozo, para decolorar las células teñidas y adheridas a las paredes de la placa.

Finalmente, el sobrenadante de las cepas de *Salmonella* en etanol (96%) de cada uno de los pozos se recuperó con una micropipeta y se depositó en una celda de poliestireno (2 mL) (BioRad) para registrar la lectura de absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Spectronic® (Genesys 2) (Figura 11). Los valores de densidad óptica (D.O) registrados en cada ensayo, se promediaron y se estimó la desviación estándar.

De acuerdo a la D.O registrada, las cepas se clasificaron en las categorías de: no productora de biopelícula y productora (débil, moderada o fuerte) de biopelícula (Stepanovic *et al.*, 2004). Para esto, se definió el límite de la D.O (D.O_L) la cual se estableció como tres veces la desviación estándar arriba de la media del testigo negativo (*S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12). De esta forma las cepas se clasificaron como sigue:

1. $D. O. \leq D.O_L$ = No productora de biopelícula (0)
2. $D.O_L < D.O \leq (2 \times D.O_L)$ = Productora débil de biopelícula (+)
3. $(2 \times D.O_L) < D.O \leq (4 \times D.O_L)$ = Productora moderada de biopelícula (++)
4. $(4 \times D.O_L) < D.O$ = Productora fuerte de biopelícula (+++)

3.3.4 Repeticiones experimentales

Se realizaron dos ensayos en diferentes periodos de tiempo para evaluar la capacidad de las cepas de *Salmonella* de formar biopelículas. El primer ensayo se estableció de marzo a junio; y el segundo, de agosto a noviembre, del 2009. Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Primer ensayo: En este ensayo se evaluaron las 15 cepas de *Salmonella* y se empleó como testigo positivo una cepa de *E. coli* silvestre, aislada de mango “Ataulfo”. En este no se incluyó al testigo negativo pero si contó con el control negativo, el cual solo contenía medio MEM simple, sin bacteria (Stepanovic *et al.*, 2004). La unidad experimental constó de una placa con dos repeticiones. Este ensayo se repitió dos veces.

Segundo ensayo: En este se incluyeron, además de las 15 cepas de *Salmonella*, las cepas *Escherichia coli* O44:H18 y *S. typhimurium* Copenhague 4,12:I 12, como testigos positivo y negativo, respectivamente; y el control negativo (medio MEM simple, sin bacteria). Este ensayo se repitió tres veces.

Con los valores de D.O registrados en cada uno de los ensayos se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por Tukey ($\alpha=0.05$), con el sistema de análisis estadístico SAS V-9.1, para determinar diferencias significativas en la formación de biopelículas entre cepas, a través del tiempo.

3.4 Sensibilidad de biopelículas de *Salmonella* a desinfectantes orgánicos e inorgánicos.

Se seleccionaron las cepas N18, A8 y S1, aisladas de nopal verdura y de muestras de agua, y de suelo de uso agrícola, respectivamente, por haberse definido en la categoría de productoras fuertes de biopelículas (S1, y A8) y como formadora de microcanales (N18 y A8). Como testigos positivo y negativo se incluyó a *Escherichia coli* O44:H18 y a *S. typhimurium* Copenhague 4,12:I 12, respectivamente.

3.4.1 Desinfectantes orgánicos e inorgánicos

Para conocer la sensibilidad de las células productoras de biopelículas a diferentes desinfectantes se probaron los ácidos cítrico y láctico (orgánicos) así como el hipoclorito de sodio (inorgánico), a las concentraciones recomendadas, para la desinfección superficial de frutas y hortalizas frescas (FDA, 2006). Para el ácido láctico se utilizó la concentración de 1.5×10^{-4} ; para el ácido cítrico, 1×10^{-4} ; y para el hipoclorito de sodio, 200 ppm. Como control se utilizó agua destilada estéril. Cada una de las soluciones empleadas se preparó asépticamente a temperatura ambiente en agua destilada estéril y en MEM. Previo a su utilización se registró el pH de las soluciones desinfectantes con un potenciómetro Conductronic pH 120.

3.4.2 Tratamiento de biopelículas con desinfectantes

De acuerdo a lo referido previamente las placas de poliestireno (Coster®) con MEN simple se inocularon con cada una de las tres cepas seleccionadas. Las placas se incubaron a 37 °C por 48 h. Concluido el periodo de incubación se retiró el medio con una pipeta Pasteur y cada pozo se lavó tres veces con agua destilada estéril. Enseguida, se depositó 1 mL de sanitizante por pozo y se incubó por 20 minutos. Transcurrida la incubación se retiró el desinfectante con una pipeta Pasteur y cada pozo se enjuagó con agua destilada estéril.

3.4.3 Recuperación y cuantificación de células viables

Con la finalidad de favorecer la detección de aquellas células que hayan permanecido viables después del tratamiento con desinfectante, en cada pozo se depositó 1 mL de CST y se incubó a 37 °C por 24 h sin agitación en

oscuridad. Se tomaron 100 μL de cada suspensión bacteriana en CST y se depositaron en tubos Eppendorf (1 mL) con 900 μL de agua peptonada buferada (DIFCO™) al 0.1 %, previamente esterilizados. Después de agitarse en un vortex por 15 s, se tomaron 100 μL para hacer diluciones seriadas (de 10^{-1} a 10^{-6}) de las cuales se tomaron 10 μL y depositaron en cajas Petri con AST para conteo de células por la técnica de la gota (Pérez *et al.*, 2002).

La técnica de cuantificación por gota consiste en depositar el inóculo en áreas definidas de un medio sólido (Figura 14) y dejar secar a temperatura ambiente por 30 min, sobre una superficie nivelada, en condiciones de esterilidad (Figura 14D). Después del secado, el medio inoculado se incubaba a 37 °C por 18 h para posteriormente realizar la cuenta de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) bajo una lupa con luz. Se contabilizan únicamente aquellos medios con desarrollo de colonias separadas, de acuerdo a la ecuación siguiente.

$$\text{Número de UFC por mL} = \text{No. De colonias} \times \text{factor de dilución} \times 100$$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Reactivación de cepas

Todas las cepas de *Salmonella* utilizadas en el estudio (Cuadro 1), se recuperaron de las muestras conservadas en agua-glicerol (50:50) a -80 °C desde el primer ensayo de reactivación. Por lo que los resultados de esta fase del estudio fueron satisfactorios.

4.2 Pureza de cepas

Para evaluar si los cultivos recuperados estaban puros una vez activados se resembraron en Agar Sangre (AS) y el análisis de las cepas obtenidas en este medio mostró cultivos homogéneos con colonias redondas de color blanco tendiendo a gris brillante y de consistencia butirosa (tipo mantequilla) y ninguna hemolítica (gamma). En Agar Enterico Hektoen (AHE) las colonias se encontraron redondas, de color negro con un halo transparente, con la morfología característica de *Salmonella*. Esto coincide con lo reportado por la NOM-114-SSA1-1994 y por Koneman (1985). En medio Agar MacConkey (MC) las colonias se desarrollaron translucidas (lactosa negativas), redondas de crecimiento uniforme (Koneman 1985; Caffer y Terragno, 2001). En Agar Soya Tripticaseina (AST) las colonias se registraron redondas de tamaño uniforme, color blanco brillantes (Figura 1). Una vez confirmada la pureza, se confirmó

también la identidad de las bacterias como *Salmonella* por el método automatizado Vitek.

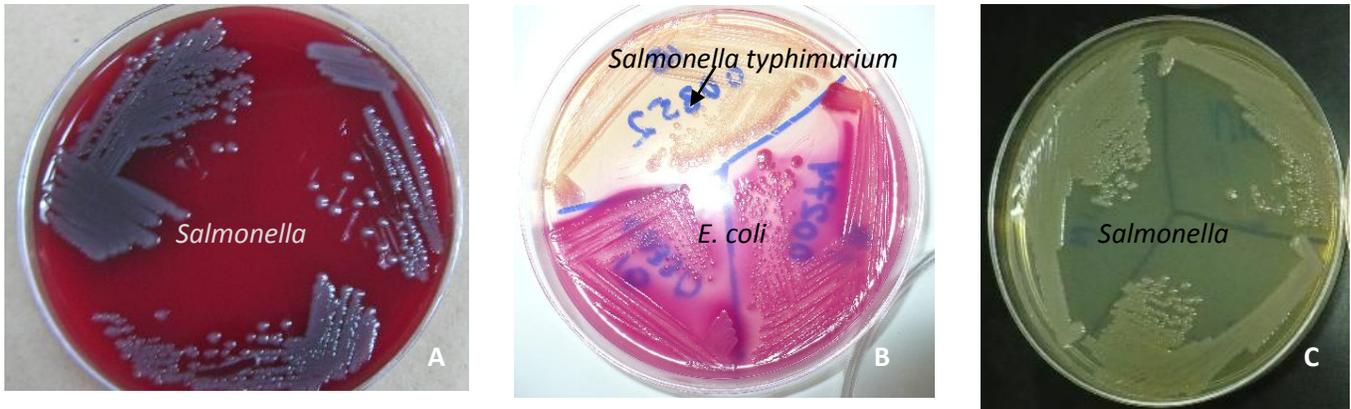


Figura 1. Colonias de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O44:H18, crecidas en tres diferentes medios de cultivo. A) Cepas de *Samonella* en Agar sangre. B) Cepas de *E. coli* y *Salmonella* en Agar MacConkey y C) Cepas de *Salmonella* en Agar soya tripticaseína incubada a 37 °C por 24 h.

4.3 Formación de matriz extracelular por cepas de *Salmonella*

Los resultados obtenidos muestran la presencia de diferentes comportamientos, uno de los cuales corresponde a un crecimiento de colonia con forma de microcanales y otro liso sin microcanales. El tipo de morfología con microcanales está relacionado con bacterias formadoras de una matriz extracelular típica de biopelículas. Las cepas que mostraron este tipo de forma muy bien definida fueron A8, S8, N3, N12, N13, N17, y N18 (Figura 2). Jonas *et al.* (2007) mencionan que este tipo de crecimiento característico, puede deberse a la producción de fibras de curli, secretadas por *Salmonella* que tiene la función de adhesión a superficies, agregación celular, y resistencia ambiental.

Estas estructuras fibrilares de curli junto con celulosa y otros polisacáridos se unen para formar una matriz extracelular visible (Steven, 2005).

En contraste la morfología de las colonias de las cepas A3, S1, S4, N4, N7, N8, N10 y N14 se encontró lisa sin los microcanales característicos de las cepas que secretan exopolisacáridos (Figura 2). No obstante estas cepas tienen la capacidad de formar biopelículas de acuerdo al método empleado de O'Toole y Kolter (1998), donde se mide la densidad óptica. De este grupo de cepas S1, N8, S4 y A3 reportaron lecturas de D.O. de 0.217, 0.184, 0.178, y 0.158 respectivamente, lo que corresponde a la categoría de productoras fuertes de biopelículas (Cuadros 6).

Los resultados aquí obtenidos concuerdan con los resultados reportados por Malcova y colaboradores (2007) quienes compararon la morfología de las colonias de *Salmonella typhimurium* con microscopia electrónica, mediciones de absorbancia y ELLA (por sus siglas en inglés Enzyme-linked lectinsorbent assay). Dichos autores señalan por sus resultados que aunque, puede existir supresión en la producción de fibras de curli y celulosa, hay sobreproducción de polisacáridos capsulares (componente de biopelículas de *Salmonella*) que hace que las células bacterianas tengan la capacidad de formar la biopelícula. Por otra parte también coinciden con los de Malcova y colaboradores (2008), quienes evaluaron este tipo de morfología (microcanales) en *Salmonella typhimurium* pero en medio Agar Rojo Congo; en este trabajo los microcanales se registraron en colonias de cepas crecidas en AST e incubadas por 38 días en condiciones ambientales.

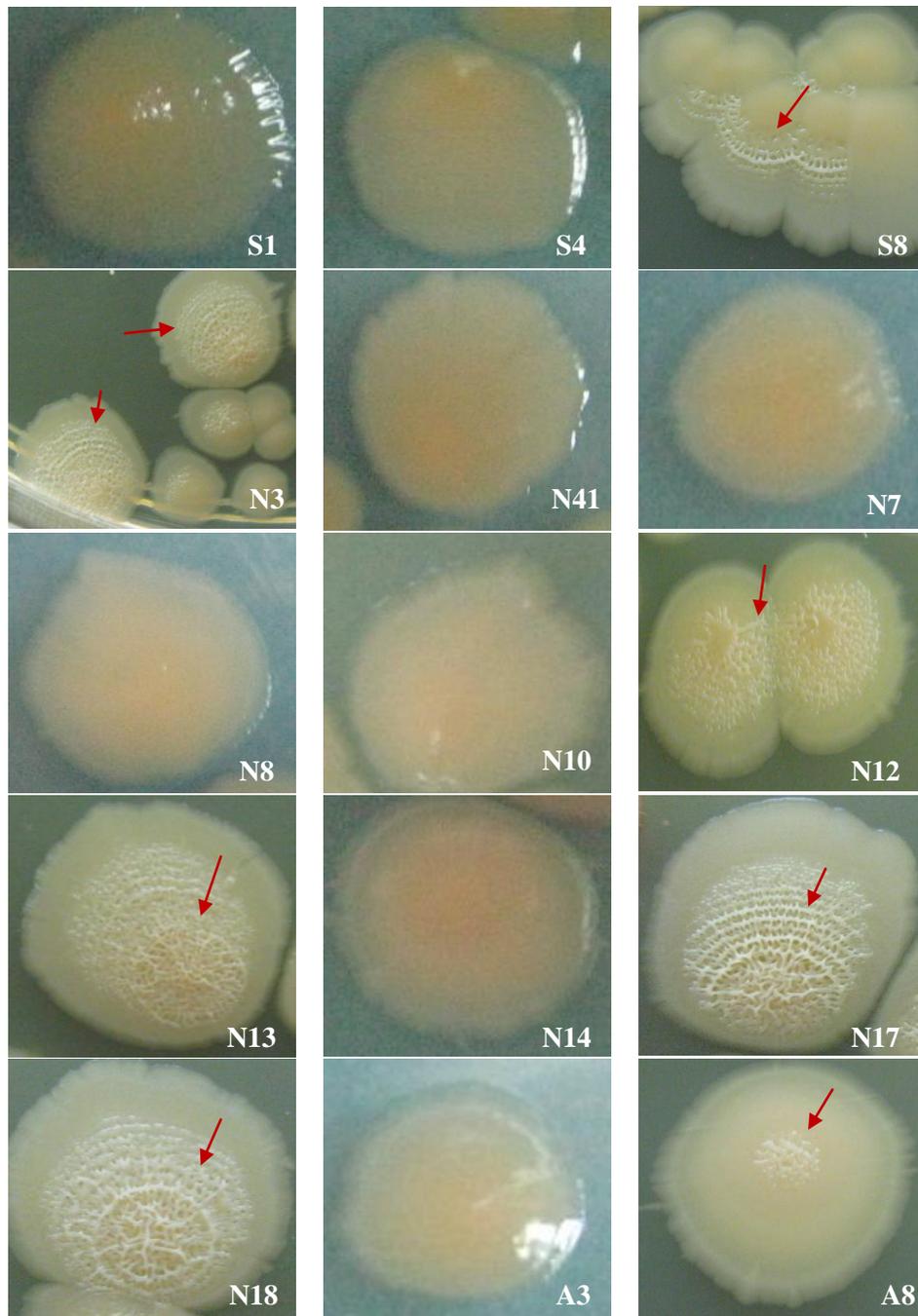


Figura 2. Morfología de colonias de *Salmonella* sp, aisladas de nopal, agua y suelo de uso agrícola, en AST e incubadas a 37 °C por 24 h, y posteriormente a temperatura ambiente por 38 días. Donde: S1, S4, N4, N7, N8, N10, N14 y A3 cepas con colonias planas sin microcanales; y, S8, N3, N12, N13, N17, N18 cepas con colonias con crecimiento tipo microcanal indicado con flecha roja.

Por los resultados obtenidos se concluye que las cepas de *S. typhimurium*, *S. javiana*, y *Salmonella* sp., tienen la capacidad de formar biopelículas independientemente de su origen (nopal verdura, agua y suelo) y que no todas son formadoras de matriz extracelular (microcanales) (Scher, 2004).

4.4 Formación de biopelículas

Los resultados obtenidos del análisis de la capacidad de *Salmonella* para formar biopelículas, por el método de O'Toole y Kolter (1998), mostraron que las todas las cepas produjeron biopelículas desde las 24 h de incubación, aunque se observaron diferencias (Tukey $\alpha=0.05$) dependiendo de los tiempos de incubación con respecto a los valores de absorbancia. En los Cuadros 2 y 3 se muestran los valores registrados de D.O. a 570 nm. En el primer ensayo, la mayoría de las lecturas de D.O a las 24 h fueron bajas comparadas con las que se obtuvieron en el segundo ensayo. Sin embargo, también se observó que la intensidad de las lecturas se incrementó con el transcurso de las horas registrando los valores de absorbancia más altos a las 48 y 72 h. Esto se corroboró con los análisis estadísticos que mostraron diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$) entre las 24 y 72 h; entre 48 y 72 h no hubo diferencias significativas (Cuadro 11 y 14).

La permanencia de *Salmonella* sobre superficies bióticas y abióticas se ha relacionado con la característica de esta bacteria para formar biopelículas, la cual la puede hacer resistir condiciones variantes del medio ambiente

(Costerton y Rodney, 2002), y constituirse en un riesgo cuando productos como el nopal se consumen frescos (Hernández *et al.*, 2009).

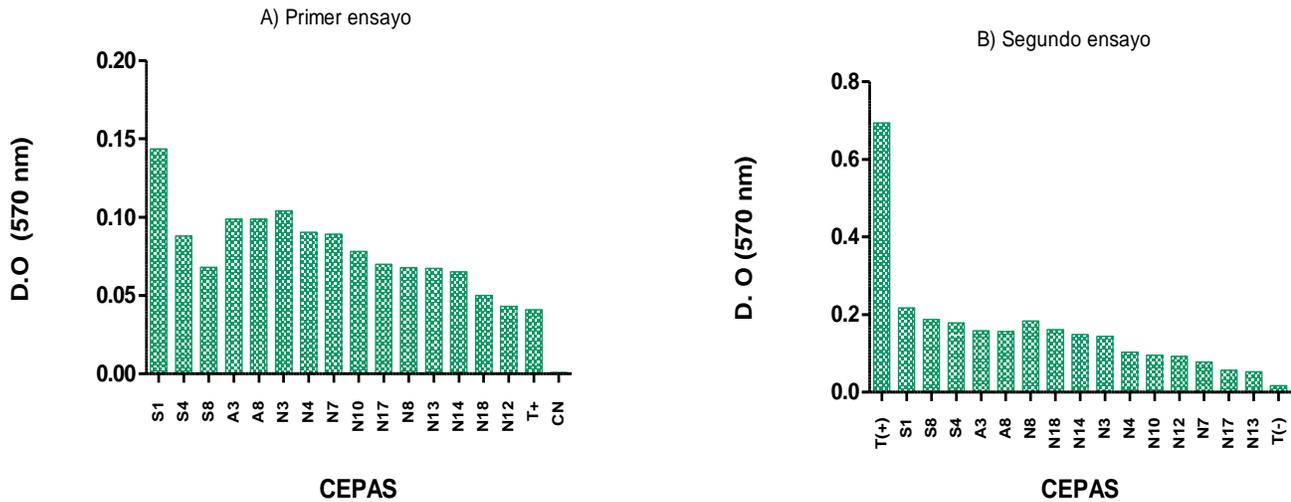


Figura 3. Valores promedio de absorbancia de los tres tiempos, relacionados con la capacidad de producir biopelículas, registrados en el primer y segundo ensayo. Las letras A, S y N indican el sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%), aisladas de agua, suelo y nopal, respectivamente; CN: pozo solo con MEM; T-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12; T+: *E. coli* O44:H18.

Las cepas S1, N3, A3 y A8, fueron las que tuvieron los valores más altos de absorbancia, de 0.143, 0.104, 0.098 y 0.098, respectivamente, para el primer ensayo (Figura 3A); mientras que, para el segundo fueron S1, S8, N8 y S4 con 0.217, 0.188, 0.184 y 0.178, respectivamente (Figura 3B). La cepa S1 fue la única que mantuvo su categoría de fuerte formadora de biopelículas entre ensayos y con los valores más altos de absorbancia siendo superada solamente por el testigo positivo, en el segundo ensayo.

En el primer ensayo, los valores más bajos de absorbancia los registraron las cepas N12 y N18 con 0.043 y 0.05 respectivamente (Cuadro 10). A las 24 h estas cepas tuvieron una moderada producción de biopelículas; pero a las 48 h, se ubicaron en la categoría de fuertes productoras de biopelículas (Cuadro 3). En el segundo ensayo las cepas N7, N17 y N13 se clasificaron como fuertes productoras de biopelículas a las 24 h; sin embargo, estas mismas cepas registraron los valores más bajos absorbancia, 0.077, 0.056 y 0.053, respectivamente (Cuadro 13) a las 48 y 72 h, ubicándose en las categorías de débiles a moderadas productoras de biopelículas. Estas discrepancias entre las cepas con mayor y menor absorbancia, puede deberse a las variaciones en los promedios de cada tiempo evaluado y sus repeticiones; el primer ensayo tuvo solo 2 repeticiones, mientras que el segundo 3 repeticiones. Los valores antes señalados corresponden a los promedios de los valores de absorbancia obtenidos en los tres tiempos evaluados.

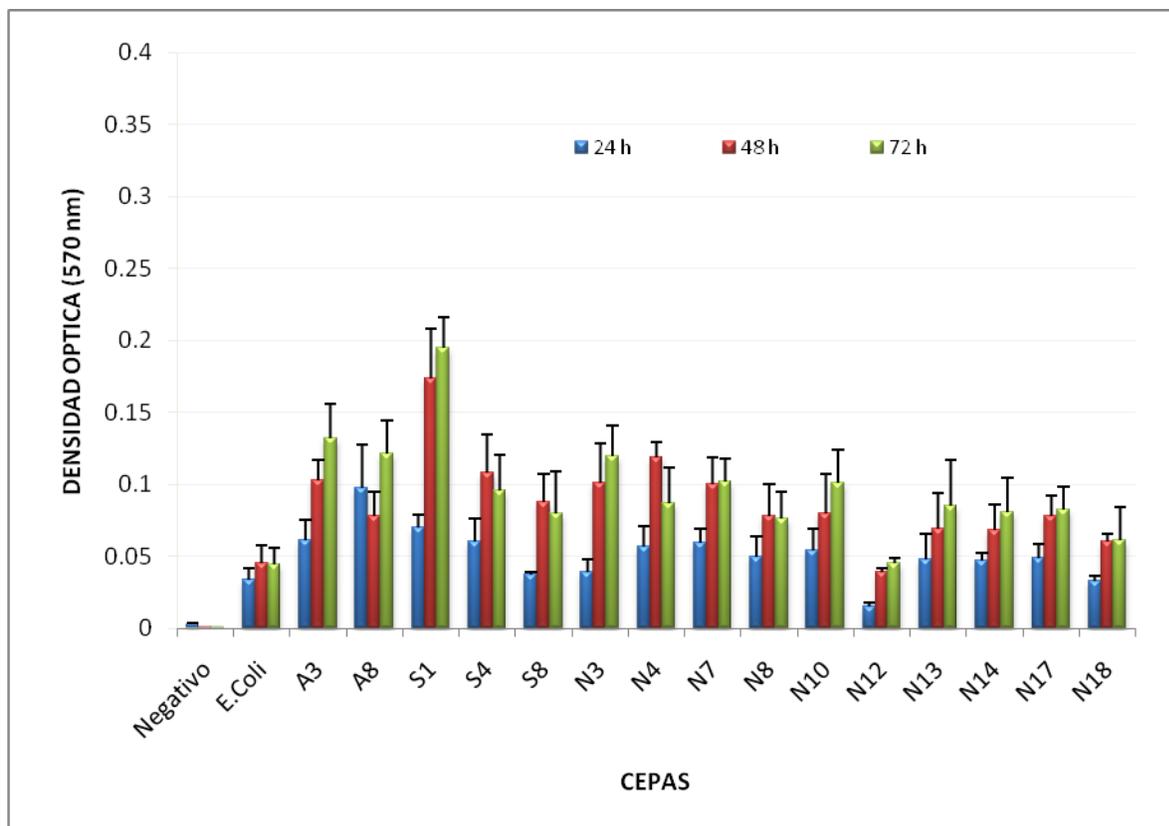


Figura 4. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos en el primer ensayo. Las letras A, S y N indican el sobrenadante de cepas aisladas de agua, suelo y nopal, respectivamente. Las barras representan la desviación estándar.

Analizando únicamente los resultados *in situ* de las cepas N3, N4, N7, N8, N10, N12, N13, N14, N17 y N18, provenientes de nopal verdura, estos mostraron diferencias significativas entre si, en los dos ensayos realizados (Cuadro 9 y 12). En el primer ensayo (Figura 4), las cepas N3, N4, N8, N10, N12, N14 y N18, se clasificaron dentro de la categoría de débiles a moderadas productoras de biopelículas a las 24 h; pero a las 48 h y 72 h éstas quedaron en la categoría de fuertes productoras de biopelículas (Cuadro 4). Estos resultados coinciden con el análisis de comparación de medias según Tukey ($\alpha=0.05$), en

el que se demuestra que no hay diferencias significativas en los periodos de 48 y 72 h (Cuadro 11). En el segundo ensayo (Figura 5), las cepas N10, N12, N13, N14 y N17 se clasificaron como débiles a moderadas productoras de biopelículas a las 48 y 72 h pero a las 24 h como fuertes productoras de biopelículas. Esto concuerda con el análisis de comparación de medias según Tukey ($\alpha=0.05$) que indica diferencia estadística significativa entre 24 y 72 h (Cuadro 14). Las cepas N7 y N8 mostraron un comportamiento más estable en ambos ensayos, tendiendo a incrementar sus valores de absorbancia conforme al transcurso del periodo de incubación (Cuadros 2 y 3).

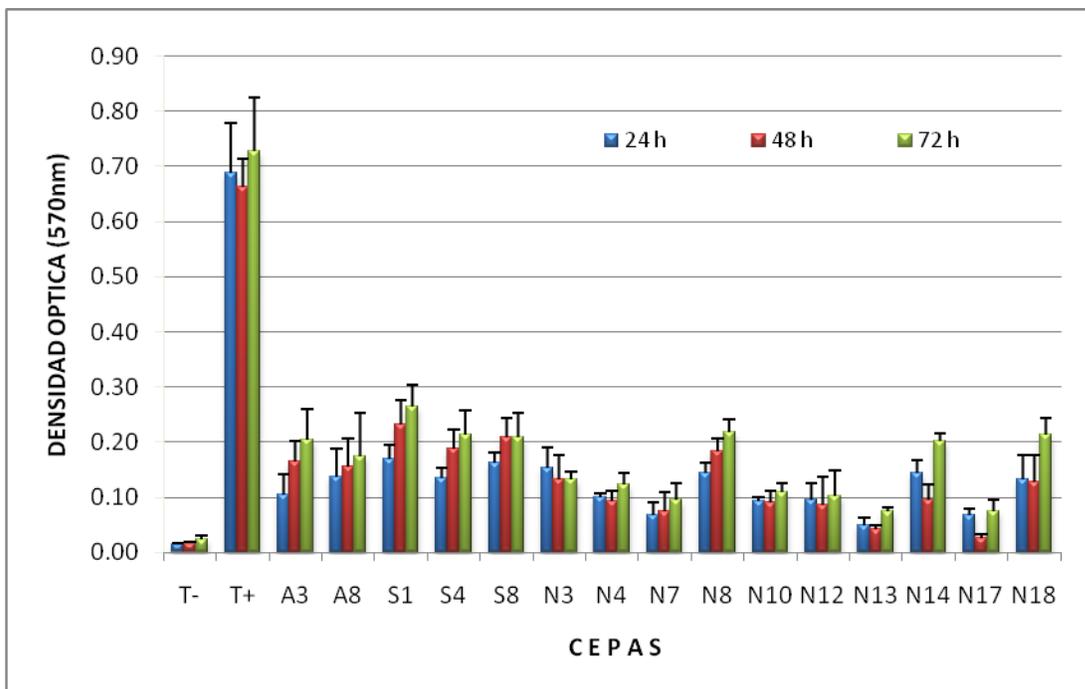


Figura 5. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos en el segundo ensayo. Las letras A, S y N indican el sobrenadante de cepas aisladas de agua, suelo y nopal, respectivamente; y T-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12; T+: *E. coli* O44:H18. Las barras representan la desviación estándar.

La variación en categorías para las mismas cepas se puede explicar en el hecho de que los valores de referencia para la asignación de categoría fueron diferentes para cada ensayo. En el primer ensayo se tomaron como referencia los valores del control negativo (no inoculado con ninguna cepa), mientras que para el segundo ensayo se utilizaron los valores del testigo negativo (*S. typhimurium* Copenhagen).

Con respecto a las cepas de agua de uso agrícola, A3 y A8 fueron las que expresaron su capacidad de fuertes productoras de biopelículas desde las 24 h. Estas cepas no mostraron diferencias significativas en ambos ensayos (Cuadro 10 y 13), lo que indica que son muy similares entre ellas con respecto a esta variable.

En relación a las cepas aisladas de suelo S1, S4 y S8 fueron las que presentaron valores más altos de absorbancia en los dos ensayos, con respecto a las cepas aisladas de nopal y agua. Sin embargo, entre estas cepas hubo diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$) (Cuadro 10). La cepa S1 mostró los valores más altos de absorbancia con respecto a S4 y S8.

Las 15 cepas de *Salmonella* evaluadas mostraron un comportamiento diferente en los dos ensayos realizados. Esta variación podría explicarse considerando que en lo único que no se tuvo control fue en la temperatura ambiental ya que los ensayos se establecieron durante las estaciones de primavera, verano y otoño. El resto de las condiciones estuvieron controladas como lo fueron los medios de cultivo y la temperatura de incubación. La producción de biopelículas *in vitro* es un proceso muy complejo y depende de numerosos

factores físicos y químicos, como la composición del medio, la temperatura, el pH, niveles de oxígeno (Hostacka *et al.*, 2010), y cambios dentro de las mismas cepas (Malcova *et al.*, 2007), entre otros.

Así mismo, las cepas mostraron variabilidad en su intensidad de producción de biopelículas con respecto al tiempo. Por ejemplo, algunas cepas mostraron un aumento en los valores de densidad óptica (indirectamente un incremento en la producción de biopelículas) en el transcurso de las horas. Esto fue el caso de las cepas A3 y A8 aisladas de agua y la cepa S1 de suelo, que en todos los ensayos presentaron una fuerte producción de biopelículas. Lo anterior coincide con Scher (2004) quien menciona que *Salmonella* tiene la capacidad de formar biopelículas independientemente de su origen (alimentos, animales entre otros).

Sin embargo, en el segundo ensayo algunas cepas de nopal como N14, N17 y N18 presentaron una fuerte producción de biopelículas a las 24 h, la cual disminuyó a las 48 h, para ubicarlas dentro de las categorías de débiles a moderadas productoras de biopelículas, no obstante a las 72 h nuevamente logran una fuerte producción. Esto podría, en parte, explicarse porque las lecturas se realizaron sobre diferentes placas, es decir, las placas para evaluar a las 24 h fueron exclusivamente para medir la absorbancia en ese periodo y se utilizaron otras distintas para las 48 y 72 h. Además esta heterogeneidad también pudo ser debido a un manejo inadecuado de las mismas en la deposición del inóculo, o bien a la tinción o lavado de placas.

4.4 Sensibilidad de *Salmonella* productora de biopelículas a desinfectantes orgánicos e inorgánicos

En este ensayo se incluyeron las cepas A8, S1 y N18, por haber sido registradas dentro de la categoría de productoras fuertes de biopelículas. Los resultados obtenidos con los desinfectantes solubilizados en agua destilada (Cuadro 7) muestran que solo los tratamientos con hipoclorito de sodio (200 ppm) y el ácido láctico (1.5×10^{-4}) aplicados por 20 min inhibieron el crecimiento de las tres cepas de *Salmonella*. Los datos registrados mostraron diferencias significativas (Cuadros 15). Estos resultados corroboran los resultados obtenidos por Joseph y colaboradores (2000), quienes reportaron que el hipoclorito de sodio a 100 ppm aplicado por 20 min sobre biopelículas, inhibe el crecimiento de células de *Salmonella* sp.

El mecanismo del cloro para inhibir microorganismos, puede ser el resultado de varios factores: oxidación de enzimas sulfhidrilo y aminoácidos; pérdida del contenido intracelular; disminución de la toma de nutrientes; inhibición de la síntesis de proteínas, decrecimiento en la toma de oxígeno; oxidación de componentes respiratorios; disminución en la producción de adenosín trifosfato, rompimiento del DNA y represión de la síntesis de DNA (Rutala, 2002).

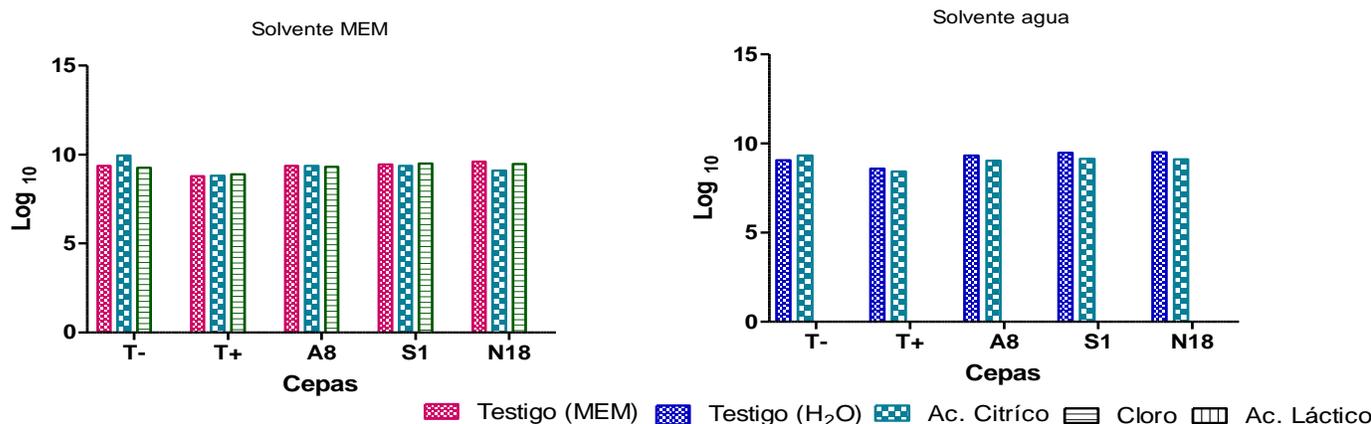


Figura 6. Comparación de efecto de desinfectantes orgánicos e inorgánicos diluidos con agua y MEM, en la viabilidad de biopelículas de *Salmonella* de 48 h de crecimiento, en placas de poliestireno incubadas a 37 °C. Donde: T-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I:1,2 y T+: *E. coli*, representan a los controles negativo y positivo, respectivamente; y, A8, S1 y N18, a cepas aisladas de agua, suelo y nopal, respectivamente.

Los resultados del ensayo con ácido cítrico e hipoclorito utilizando MEM (200 ppm) como solvente, no mostraron inhibición del crecimiento de las células adheridas de las cepas A8, S1 y N8, ya que estas se mantuvieron viables mostrando cuentas similares a las obtenidas con el testigo. Esto, en el caso del cloro, pudiera deberse a la presencia de materia orgánica (MEM) que interfiere con la actividad de dicho compuesto (Rutala, 2002). Los resultados también concuerdan con los obtenidos por Zhuang *et al.*, (1996) quienes encontraron que el ácido cítrico al 0.2% carece de efecto inhibitorio sobre *Salmonella moutevideo* en tomate.

Con relación al ácido láctico disuelto en MEM a la concentración de 1.5×10^{-4} se encontró que fue el tratamiento más efectivo para inhibir el crecimiento de

las células bacterias adheridas a las placas de poliestireno (Figura 6). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rupasinghe y colaboradores (2006), quienes reportaron una disminución de 4 log cuando evaluaron la eficacia de del ácido láctico (1.5%) combinado con ácido peroxiacético (80 ppm) en manzanas inoculadas con *Salmonella* Newport.

Aun cuando los ácidos orgánicos, en este caso ácido cítrico y ácido láctico, registraron valores de pH cercanos (1.8 y 1.7, respectivamente) su acción inhibitoria depende también de otros factores como el tipo de ácido, la constante de disociación del mismo y la concentración (Buchanan *et al.*, 1993; Ita y Hutkins, 1991). En este caso el ácido láctico puede tener dos mecanismos posibles de acción antimicrobiana. Una es la habilidad del ácido para atravesar la membrana celular, en esta disociación del ácido en la célula, acidifica el interior de la célula. Otra es la habilidad específica del ácido láctico para bajar la actividad acuosa (Rupasinghe *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos permiten concluir que el hipoclorito disuelto en agua y el ácido láctico disuelto en agua y MEM durante el mismo periodo de tiempo, son buenos tratamientos para inhibir el crecimiento de bacterias que forman biopelículas. Sin embargo, el ácido láctico a pesar de ser el más efectivo tiene la desventaja de que al ser un producto derivado del metabolismo bacteriano es costoso. Por lo tanto el hipoclorito de sodio presenta mayores ventajas debido a que es económico además de ser un desinfectante accesible, inactiva a un amplio espectro de microorganismos y no deja residuos tóxicos para los

humanos a bajas concentraciones (Rupasinghe *et al.*, 2006), la dureza del agua no le afecta y es de rápida acción (Rutala 2002).

V. CONCLUSIONES

- Las cepas de *Salmonella* N4, N7, N8, N10,N12, N13, N14, N17, N18, A3, A8, S1,S4 y S8, aisladas de cladodios de nopal verdura (N), agua (A) y suelo (S) de uso agrícola de la región de Tlalnepantla Morelos, tienen la capacidad de formar biopelículas.
- Las cepas S1, S4, S8 de suelo y A3 de agua, tuvieron la mayor capacidad formativa de biopelículas.
- Las cepas S1, S4 y S8 de suelo expresan su capacidad de adhesión más rápidamente que las cepas de agua A3 y A8 y que las de nopal N4, N7, N8, N10, N12, N13, N14, N17, N18.
- El ácido láctico a 1.5×10^{-4} y el hipoclorito de sodio a 200 ppm disueltos en agua inhibieron significativamente el crecimiento de células de *Salmonella* cuando se aplicaron por 20 min a placas de poliestireno con formación de biopelículas de las cepas A8, S1 y N8.
- El ácido cítrico a 1×10^{-4} ppm no tuvo efecto inhibitorio sobre células de *Samonella* cuando se aplicó por 20 min a placas de poliestireno con formación de biopelículas de las cepas A8, S1 y N8.

VI. REFERENCIAS

- Allison, D. G., Ruiz, B., San Jose, C., Jaspe, A. and Gilbert, P.1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. FEMS Microbiol. Lett. 167: 179–184
- Annous, B. A., B. S. Ethan, P. Cooke and A. Burke. 2005. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on Cantaloupe melons. J. Food Safety 25: 276-287
- Annous, A., J .L Smith, P. M Fratamico, and P. M. Fratamico. 2009. Biofilms in fresh fruit and vegetables. Submitted to: Book Chapter Biofilms in the food and beverage industries. 1st edition. Boca Raton, FL: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. p. 517-535.
- ASERCA. 1999. La tuna; base del desarrollo de culturas mesoamericanas. Claridades agropecuarias No. 71. México p. 44
- Barton, D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. Nutrition Research Reviews. 13: 279-299
- Bell, C., and A. Kyriakides. 2002. *Salmonella*: a practical approach to the organism and its control in foods. Blackwell Science Ltd., London, United Kingdom. p. 13
- Beuchat, L. R. 1995. Pathogenic Microorganisms Associated with Presh Produce. J. Food Protec. 59: 204- 216
- Beuchat, Larry R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw . Who/ FSF/FOS/98.2. p 49
- Bower, C.K., McGuire, J., Daeschel, M.A., 1995. Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 61: 992–997.
- Branda, S. S., A. S. Vik, L. Friedman, and R Kolter. 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiol. 13 (1): 20-26

- Brendan, A., Niemira and Ethan, B. S. 2004. Sensitivity of planktonic and biofilm associated *Salmonella* spp. to ionizing radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (5): 2732-2736
- Buchanan, R.L., Golden, M.H. and Whiting, R.C. 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J. Food Prot.* 56:474-478, 484.
- Burmolle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sorensen, S.J. and Kjelleberg, S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3916–3923.
- Carvajal, L., Gómez A., and Ochoa, S. 2007. Hydraulic flushing modeling in pipes to control of biofilm growth. *Dyna Rev. Fac. Nac. minas.* 74: 63-72.
- Claridades agropecuarias.1998. Nopal, tradición alimentaria de México. INFOSECA, SAGARPA. 44 p.
- Corrales, G. 2000. Tendencias actuales y futuras en el procesamiento de Nopal y Tuna. *CIESTAAM.UACH.* 8-11.
- Costerton, J.W., Cheng K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.*41:435-64.
- Costerton W. and Rodney D. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical microbiology reviews.* 2 (15): 167–193
- Davey, M. E., and O'toole G. A.. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847–67.
- Dunne, J. 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?. *Clinical microbiology reviews.* p. 155–166

- Edstrom. Biofilms. Key understanding and controlling bacterial growth in Automated Drinking Water Systems.
- FAO. Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de servicios agrícolas 162.
- Fett, W. F. (2000) *J. Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. Food Protect.* 63 (5): 625–632.
- Flores, V., Luna, E. y Ramírez, M.1995. Mercado mundial del nopalito. ASERCA UACH. p 55
- Fuqua, C., Winans, S.C. and Greenberg E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of *quorum-sensing* transcriptional regulators.*Annu Rev Microbiol.* 50: 727-51.
- García V., Olguín R., Ramos G., Rodríguez G., y Reynoso C. 2006. Efecto antidiabético del cladodio del nopal comercial en ratas sanas y diabéticas. Segundo congreso nacional de química medica. Centro de Física Aplicada y Tecnología Aplicada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro
- Garibay Bagnis. 2006. Estudio del efecto hipoglucémico de algunas plantas utilizadas en México para el control de la diabetes. *Revista de Salud Publica CICATA-IPN.* No. 11
- Granados, S. D. 1991. El nopal: historia, fisiología, genética e importancia frutícola, México. Trillas.
- Hamilton WA. 1998. Classical model of corrosion by sulfate-reducing bacteria (SRB). *Annu Rev Microbiol.* 39: 195-217.
- Hancock, V. and Per K. 2006. Global gene expression profiling of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* during biofilm growth in human urine. *Microbiology.* 75 (2): 966-976.

- Hanes, D. Nontyphoid (2003) *Salmonella*. In Miliotis MD, Bier JW, editors. International handbook of foodborne pathogens. New York: Marcel Dekker, Inc. 135-149.
- Hernández-A. A. M., P. Landa-S., G. Mora-A., C. A. Eslava-C., J. E. Call, A. C. S. Porto-Fett, and J. B. Luchansky. 2009. Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. Abstracts of the Annual Meeting of the International Association for Food Protection (37): 74-75.
- Hood, S., and Zottola, E. 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. International Journal of Food Microbiology 37(2-3): 145-153.
- Hostacka, A., Ciznar, I. and Stefkovicova. 2010. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. Folia Microbiol. 55 (1): 75-78.
- Huges, K. A, Sutherland, I. W. and Jones, M. V. 1998a. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. Microbiology. 144: 3039–3047.
- Huges, K. A, Sutherland, I. W. and Jones, M. V. 1998b. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases novel tools for study of bacterial biofilms Microbiology. 85 (3): 583–590.
- Hyounghill, L., Bin, Z., Wei L., Hao F and Scott. 2009 Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling. Journal of Food Engineering. 93 (3): 354-364
- Ita, P.S. and Hutkins, R.W. 1991. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acids. J. Food Prot. 54:15-19.

- Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Romling, U., Belova, L.M., Melefors, O. 2007. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol.* 7: 70
- Joseph, B., Otta, S. K., and Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizer. *Int J of Food Microbiol.* 64 (3): 367-372
- Koneman. 1995. Diagnóstico microbiológico, texto y atlas en color. 6ta., edición. Editorial médica Panamericana. Impreso en Argentina. 1500 p.
- Korber, D.R., Choi, A., Wolfaardt, G.M., Ingham, S.C. and Caldwell, D.E. 1997. Substratum topography influences susceptibility of *Salmonella enteritidis* biofilms to trisodium phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3352, 3358
- Kumar, G. and Anand. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J of Food Microbiol.* 42: 9-27
- Lapidot, A., Rombling, U. and Yaron, S. 2006. Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. *Int J Food Microbiol* 109: 229–233.
- Lasa, I. 2006. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol.* 9(1): 21-8
- Liu, L., Shawn, Tan., Won, J., Allen., Smit, Jianghong Meng and Arvind, A. Bhagwat. 2009. Osmoregulated periplasmic glucans are needed for competitive growth and biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in leafy-green vegetable washwaters and colonization in mice. *FEMS Microbiol Lett* 292 :13–20

- Liu, X., Yousef, A., Chism, G.W. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric fields. *J. Food Safety*. 16: 287–300.
- Mah, T.F. and O'Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9: 34-9
- Malcova, M., Hradecckar, H., Karpiskova, R. and Rychlik. 2007. Biofilm formation in field strains of salmonella enteric serovar *Typhimurium*: identification of new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Veterinary microbiology*. 129: 360-366.
- Maurer, J. and Lee, M. 2005. *Salmonella*: virulence, stress response and resistance. In: *Understanding Pathogen Behaviour: Virulence, Stress Response and Resistance*. Griffiths, M. (Ed.) Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. p. 215–239
- McLandsborough, A., Rodriguez, D. and Perez-Conesa, J. 2006. *Biofilms: At the Interface between Biophysics and Microbiology*. Food Biophysics, Springer. 1: 94-114
- Medellín, M., Saldivar, S. y Garza, J.V. 1998. Efecto de la ingestión de nopal crudo y cocido (*Opuntia ficus indica*) en el crecimiento y perfil de colesterol total, lipoproteína y glucosa en sangre de ratas. *Arch Latinoam Nutr.* 48(4): 316-23
- O' Toole, G. and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*. 28 (3): 449-461
- Otto, K., Norbeck, J., Larsson, T., Karlsson, K. Hermansson. 2001. Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 183: 2445–2453

- Pérez, R. D., Domínguez, V. I. y Sosa, E. 2002. Evaluación del método de siembra en placa traza de la dilución, en el control de calidad de bancos de mutantes de *Escherichia coli* K12. *Biotecnología aplicada*. 19:169-173
- Qian, Z., Sagers, R.D. and Pitt, W.G., 1997. The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Ann. Biomed. Eng.* 25: 69–76
- Rupasinghe, V., Boulter-Bitzer, J. and Odumeru, J. 2006. Lactic acid improves the efficacy of anti-microbial washing solutions for apples. *J. of agriculture and environment* 4(2): 44-48
- Rutala, W. 2002. Draft Guideline for Disinfection and Sterilization in Health care Facilities
- Scher, K., Romling, U. and Yaron, S. 2005. Effect of heat, acidification and chlorination on salmonella enteric serovar *Typhimurium* cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Applied and environmental microbiology*. 71(3): 1163-1168
- Stepanovic, S., I. Circovic, Ranin, L. and Svabic-Vlahovic, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 428-432
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J of Microbiol Methods*. 40: 175 –179
- Tellez S., Briones V. y Goyache J. 2004. Una bacteria llamada *Salmonella*. *Revista Porci.* (81): 11-21
- Thiele-Bruhn, S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils. *J Plant Nutr Soil Sci.* (166): 145–167

- Toledo-Arana, A, Merino N., Vergara-Irigaray M., Débarbouillé M., Penadés J.R. and Lasa, I. 2005. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, ica-independent biofilm in the absence of the arlRS two-component system. J Bacteriol. 187:5318-29
- Torres, V. 2002. Agentes patógenos transmitidos por alimentos. Primera edición. Universidad de Guadalajara. 1:403
- Uribe, M.V. y Suárez, M.V. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Revista Colombia Médic. 3(2): 151-158
- Vanegas, L., Correa, C., Morales, M., Martínez, L., Rúgeles, G. and Jiménez, I. 2009 Antibiotic resistance of bacteria isolated from biofilms in a food processing plant. Revista mvz Córdoba. 14 (2).
- Zhuang, R., Beuchat, L.R., Chinnan, M.S. and Shewfelt, L.R. 1996. Inactivation of *Salmonella montevideo* on Tomatoes by Applying Cellulose-Based Edible Films. J. Food Protec. 59 (8): 808-812
- <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASSubstancesSCOGSDatabase/default.htm>. Fecha de consulta: 12 de mayo de 2010.
- <http://www.agronet.com.mx/cgi/articles.cgi?Action=Viewhistory&Article=3&Type=A&Datemin=2003-02-01%2000:00:00&Datemax=2003-02-31%2023:59:59>
Fecha de consulta: Julio de 2010

CUADROS

Cuadro 2. Valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%), registrados en el primer ensayo. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones. Las letras indican el sobrenadante de cepas aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006.

Cepa*	Tiempo de incubación (h) / Densidad óptica (570 nm)		
	24	48	72
Testigo-	0.002	0.000	0.000
Testigo+	0.033	0.045	0.044
A3	0.062	0.103	0.132
A8	0.098	0.078	0.121
S1	0.070	0.173	0.195
S4	0.060	0.108	0.096
S8	0.037	0.087	0.080
N3	0.039	0.101	0.120
N4	0.057	0.119	0.087
N7	0.060	0.100	0.102
N8	0.049	0.078	0.076
N10	0.054	0.080	0.101
N12	0.015	0.039	0.045
N13	0.048	0.069	0.085
N14	0.047	0.068	0.081
N17	0.049	0.078	0.083
N18	0.033	0.060	0.062

Testigo-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12;

Testigo+: *E. coli* O44:H18

Cuadro 3. Valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%), registrados en el segundo ensayo. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Las letras indican el sobrenadante de cepas aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006.

Cepa*	Tiempo de incubación (h)		
	24	48	72
Testigo-	0.014	0.016	0.024
Testigo+	0.688	0.662	0.727
A3	0.105	0.165	0.205
A8	0.138	0.156	0.173
S1	0.169	0.231	0.265
S4	0.136	0.189	0.213
S8	0.163	0.208	0.208
N3	0.154	0.134	0.132
N4	0.101	0.093	0.123
N7	0.069	0.074	0.096
N8	0.145	0.183	0.219
N10	0.094	0.091	0.109
N12	0.097	0.086	0.102
N13	0.050	0.042	0.074
N14	0.144	0.096	0.202
N17	0.068	0.026	0.076
N18	0.134	0.128	0.214

Testigo-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12;
 Testigo+: *E. coli* O44:H18

Cuadro 4. Clasificación de cepas de *Salmonella* aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006. Las cepas se clasificaron en las categorías de no productora y productora débil, moderada o fuerte de biopelículas, de acuerdo a los valores de absorbancia registrados en sobrenadantes en etanol (96%). Estos resultados corresponden al primer ensayo.

Cepa	Repetición 1 (h)			Repetición 2 (h)			Repetición 3 (h)		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T+	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
A3	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
A8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S1	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S4	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S8	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N3	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N4	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N8	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N10	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N12	+	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
N13	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
N14	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N17	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N18	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Donde: 0, no productora; +, productora débil, ++, productora moderada; y +++, productora fuerte. CN-: solo MEM; Testigo+: *E. coli*

Cuadro 5. Clasificación de cepas de *Salmonella* aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006. Las cepas se clasificaron en las categorías de no productora y productora débil, moderada o fuerte de biopelículas, de acuerdo a los valores de absorbancia registrados en sobrenadantes en etanol (96%). Estos resultados corresponden al segundo ensayo.

Cepa	Repetición 1 (h)			Repetición 2 (h)			Repetición 3 (h)			Repetición 4 (h)		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
T+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
T-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
A8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+
S1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
S8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
N3	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
N4	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
N7	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	++	+
N8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N10	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
N12	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	++	+	+++	++	+
N13	+++	++	+	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	++
N14	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
N17	+	+	0	+++	+	++	+++	++	+++	+++	++	+++
N18	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Donde: 0, no productora; +, productora débil, ++, productora moderada; y +++, productora fuerte. Testigo-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12; Testigo+: *E. coli* O44:H18

Cuadro 6. Clasificación de cepas de *Salmonella* aisladas de nopal verdura (N) y de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola, colectados en Tlalnepantla Morelos en Junio de 2006. Las cepas se clasificaron en las categorías de no productora y productora débil, moderada o fuerte de biopelículas, de acuerdo a los valores de absorbancia registrados en sobrenadantes en etanol (96%). Estos resultados corresponden a los promedios obtenidos del primer y segundo ensayo.

Cepa	Clasificación de cepas en categorías						Producción de Matriz de exopolisacaridos
	Primer ensayo			Segundo ensayo			
	24	48	72	24	48	72	
T-	-	-	-	0	0	0	-
T+	++	+++	+++	+++	+++	+++	-
A3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	No
A8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Si
S1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	No
S4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	No
S8	++	+++	+++	+++	+++	+++	Si
N3	++	+++	+++	+++	+++	+++	Si
N4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	No
N7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	No
N8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	No
N10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	No
N12	+	+++	+++	+++	+++	+++	Si
N13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Si
N14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	No
N17	+++	+++	+++	+++	++	+++	Si
N18	++	+++	+++	+++	+++	+++	Si

Donde: 0, no productora; +, productora débil, ++, productora moderada; y +++, productora fuerte. La producción de la matriz se registró en cepas crecidas en AST a 37 °C por 24 h y posteriormente a temperatura ambiente por 38 días. Testigo-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12; Testigo+: *E. coli*

Cuadro 7. Efecto de desinfectantes orgánicos e inorgánicos, disueltos en agua destilada estéril, en la viabilidad de células de *Salmonella*, desarrolladas en biopelículas formadas en placas de poliestireno por 48 h e incubadas a 37 °C.

Cepa	Testigo (agua estéril)		Ac. cítrico 1 X 10 ⁻⁴ ppm		Hipoclorito de sodio 200 ppm		Ac. láctico 1.5 X 10 ⁻⁴ ppm	
	UFC/mL	Log	UFC/mL	Log	UFC/mL	Log	UFC/mL	Log
<i>S. typhimurium</i> Copenhague	1.17 X 10 ⁹	9.07	2.1 X 10 ⁹	9.32	NC	NC	NC	NC
<i>E. coli</i> O44 : H18	3.77X 10 ⁸	8.58	2.6 X 10 ⁸	8.43	NC	NC	NC	NC
A8	2.1 X10 ⁹	9.33	1 X 10 ⁹	9.03	NC	NC	NC	NC
S1	3 X 10 ⁹	9.48	1.4 X 10 ⁹	9.16	NC	NC	NC	NC
N18	3.2 X 10 ⁹	9.51	1.3 X10 ⁹	9.11	NC	NC	NC	NC

Donde: NC, no creció. Las letras indican las cepas aisladas de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola y de nopal verdura (N).

Cuadro 8. Efecto de desinfectantes orgánicos e inorgánicos, disueltos en MEM (Medio Esencial Mínimo), en la viabilidad de células de *Salmonella*, desarrolladas en biopelículas formadas en placas de poliestireno por 48 h e incubadas a 37 °C.

Cepa	Testigo (MEM)		Ac. Cítrico a 1 X 10 ⁻⁴ ppm		Hipoclorito de sodio a 200 ppm		Ac. Láctico a 1.5 X 10 ⁻⁴ ppm	
	UFC/mL	Log	UFC/mL	Log	UFC/mL	Log	UFC/mL	Log
<i>S. typhimurium</i> Copenhague	2.3 X 10 ⁹	9.37	8.5 X10 ⁹	9.93	1.7 X 10 ⁹	9.24	NC	NC
<i>E. coli</i> O44 : H18	6 X 10 ⁸	8.78	6.3 X 10 ⁸	8.80	8 X 10 ⁸	8.90	NC	NC
A8	2.3 X 10 ⁹	9.37	2.3 X 10 ⁹	9.37	2 X 10 ⁹	9.31	NC	NC
S1	2.8 X 10 ⁹	9.45	2.3 X 10 ⁹	9.37	3.2 X 10 ⁹	9.51	NC	NC
N18	3.8 X 10 ⁹	9.59	1.2 X10 ⁹	9.09	2.9 X 10 ⁹	9.47	NC	NC

Donde: ND, no creció. Las letras indican las cepas aisladas de agua (A) y suelo (S) de uso agrícola y de nopal verdura (N).

Cuadro 9. Análisis de varianza de los valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos en el primer ensayo.

Variable dependiente: abs					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	56	0.29107651	0.00519779	5.37	<.0001
Error	96	0.09299894	0.00096874		
Total correcto	152	0.38407545			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	abs Media	
	0.757863	41.84991	0.031125	0.074372	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cepa	16	0.14306324	0.00894145	9.23	<.0001
tiempo	2	0.04721232	0.02360616	24.37	<.0001
cepa*tiempo	32	0.03206478	0.00100202	1.03	0.4344
rep	2	0.06129196	0.03064598	31.63	<.0001
tiempo*rep	4	0.00744421	0.00186105	1.92	0.1131
Tests de hipótesis usando el MS Anova para tiempo*rep como un término de error					
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
tiempo	2	0.04721232	0.02360616	12.68	0.0186
rep	2	0.06129196	0.03064598	16.47	0.0117

Cuadro 10. Análisis de comparación de los valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) en el primer ensayo según Tukey ($\alpha=0.05$).

Tukey Agrupamiento	Media	No. de observaciones	cepa
A	0.14383	9	S1
A			
B A	0.10400	9	N3
B A			
B A C	0.09883	9	A3
B A C			
B A C	0.09878	9	A8
B C			
B D C	0.09039	9	N4
B D C			
B D C	0.08906	9	N7
B D C			
B D C	0.08789	9	S4
B D C			
B D C	0.07822	9	N10
B D C			
B D C	0.07000	9	N17
B D C			
B D C	0.06811	9	S8
B D C			
B D C	0.06772	9	N8
B D C			
B D C	0.06739	9	N13
B D C			
B D C	0.06522	9	N14
D C			
E D C	0.05006	9	N18
E D			
E D	0.04306	9	N12
E D			
E D	0.04089	9	T+
E			
E	0.00088	9	CN

Nota: Medias con la misma letra son significativamente iguales.

Cuadro 11. Análisis de comparación de medias con respecto al tiempo, de los valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%), según Tukey ($\alpha=0.05$).

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	tiempo (h)
A	0.090176	51	72
A	0.083069	51	48
B	0.049871	51	24

Nota: Medias con la misma letra son significativamente iguales.

Cuadro 12. Análisis de varianza de los valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos en el segundo ensayo.

Variable dependiente: abs					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	59	8.81520705	0.14941029	26.96	<.0001
Error	348	1.92888628	0.00554278		
Total correcto	407	10.74409333			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	abs Media	
	0.820470	46.40957	0.074450	0.160419	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cepa	16	8.44799829	0.52799989	95.26	<.0001
tiempo	2	0.12880443	0.06440221	11.62	<.0001
cepa*tiempo	32	0.15284699	0.00477647	0.86	0.6858
rep	3	0.02105469	0.00701823	1.27	0.2858
tiempo*rep	6	0.06450265	0.01075044	1.94	0.0738
Tests de hipótesis usando el MS Anova para tiempo*rep como un término de error					
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
tiempo	2	0.12880443	0.06440221	5.99	0.0372
rep	3	0.02105469	0.00701823	0.65	0.6098

Cuadro 13. Análisis de comparación de medias de las cepas, de los valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) en el segundo ensayo según Tukey ($\alpha=0.05$).

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	cepa
A	0.69400	24	EC
B	0.21763	24	S1
B			
B	0.18846	24	S8
B			
B	0.18442	24	N8
B			
B	0.17892	24	S4
B			
C B	0.16121	24	N18
C B			
C B	0.15829	24	A3
C B			
C B	0.15625	24	A8
C B			
C B D	0.14904	24	N14
C B D			
C B D	0.14350	24	N3
C D			
C E D	0.10288	24	N4
C E D			
C E D	0.09513	24	N10
C E D			
C E D	0.09338	24	N12
E D			
F E D	0.07763	24	N7
F E			
F E	0.05646	24	N17
F E			
F E	0.05333	24	N13
F			
F	0.01663	24	ST

Nota: Medias con la misma letra son significativamente iguales.

Cuadro 14. Análisis general de comparación de medias con respecto al tiempo de los valores de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados en el segundo ensayo según Tukey ($\alpha = 0.05$).

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	tiempo (h)
A	0.18528	136	72
A			
B A	0.15115	136	48
B			
B	0.14482	136	24

Nota: Medias con la misma letra son significativamente iguales.

Cuadro 15. Análisis de varianza del efecto de los desinfectantes orgánicos e inorgánicos, en la viabilidad de células de *Salmonella*, desarrolladas en biopelículas formadas en placas de poliestireno por 48 h e incubadas a 37 °C

Variable dependiente: ufc					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	55	4.0418362E20	7.3487932E18	2.58	0.0001
Error	64	1.8212817E20	2.8457527E18		
Total correcto	119	5.863118E20			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	ufc Media	
	0.689366	124.9428	1686935893	1350166667	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cepa	4	3.7592222E19	9.3980554E18	3.30	0.0160
trat	7	1.570384E20	2.2434057E19	7.88	<.0001
cepa*trat	28	1.3493185E20	4.8189945E18	1.69	0.0422
rep	2	1.0172582E19	5.0862908E18	1.79	0.1757
trat*rep	14	6.4448578E19	4.6034699E18	1.62	0.0984
Tests de hipótesis usando el MS Anova para trat*rep como un término de error					
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	7	1.570384E20	2.2434057E19	4.87	0.0058
rep	2	1.0172582E19	5.0862908E18	1.10	0.3585

Cuadro 16. Análisis general de comparación de medias, con respecto a tratamientos de los desinfectantes sobre biopelículas de cepas de *Salmonella*. de 48 h e incubadas a 37 °C (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	trat
A	3038666667	15	cc/MEM
A			
B A	2393333333	15	MEM
B A			
B A	2160000000	15	CL2/MEM
B A			
B A	1976000000	15	agua
B A			
B A	1233333333	15	cc/A
B			
B	0	15	CL2/A
B			
B	0	15	Lac/A
B			
B	0	15	Lac/MEM

Donde: MEM: medio esencial minimoc; cc/MEM: ac. cítrico a 1×10^{-4} ppm disuelto en MEM; CL2/MEM: hipoclorito de sodio a 200ppm disuelto en MEM; Lac/MEM: ac. láctico a 1.5×10^{-4} ppm disuelto en MEM; cc/A: ac. cítrico a 1×10^{-4} ppm disuelto en agua; CL2/A: hipoclorito de sodio a 200ppm disuelto en agua; Lac/A: ac. láctico a 1.5×10^{-4} ppm disuelto en agua.

Nota: Medias con la misma letra son significativamente iguales.

FIGURAS



Figura 7. Etapas en la preparación del medio Agar Sangre (AS). A) Enfriamiento del Agar Base de Sangre (ABS) después de autoclaveado en baño María a 45°C. B) Adición de sangre de carnero al medio ABS. C) Homogeneización de AS por agitación hasta que todo el medio se encuentre rojo. D) Vaciado de AS en cajas Petri estériles.



Figura 8. Preparación de Medio Esencial Mínimo (MEM). A) Vaciado del MEM en agua desionizada estéril. B) Adición de glutamina, bicarbonato y HEPES con pipeta nueva y estéril. C) Vaciado del medio al filtro Stericup®. D) Filtrado del medio usando una bomba de vacío.

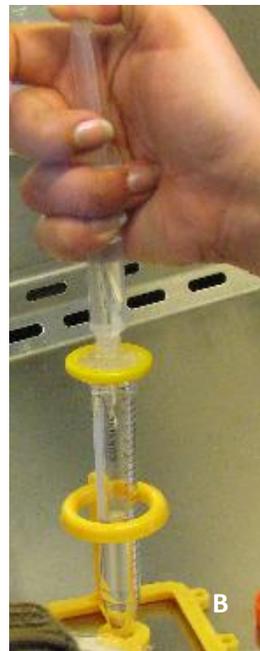
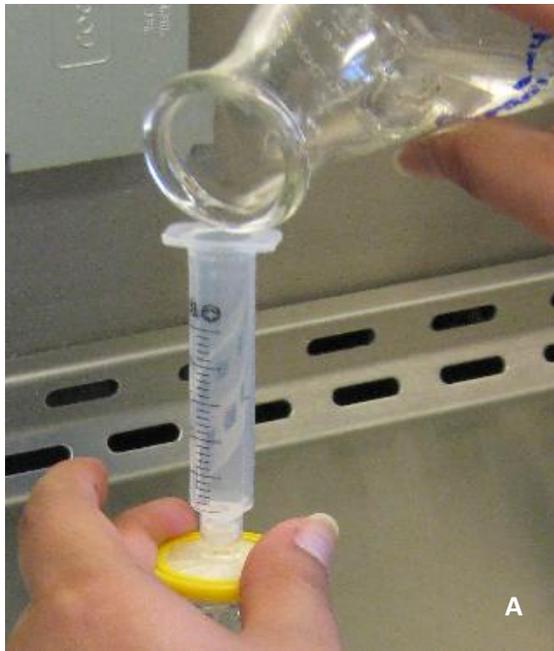


Figura 9. Esterilización de glucosa para el MEM. A) Vaciado de la glucosa diluida en agua en una jeringa para su filtración. B) Filtrado de la glucosa al 4% a través de un filtro MILLEX® de 0.22 μm desechable.

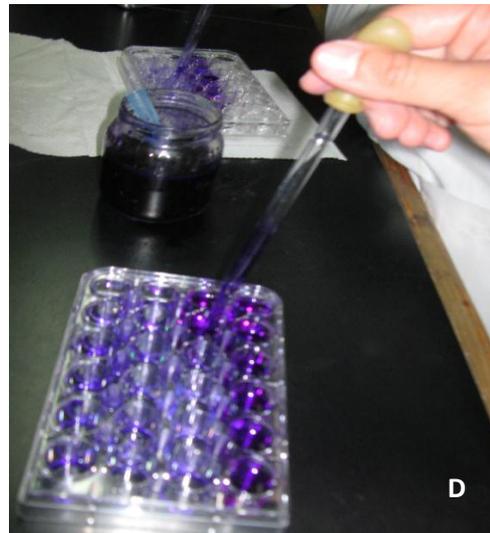
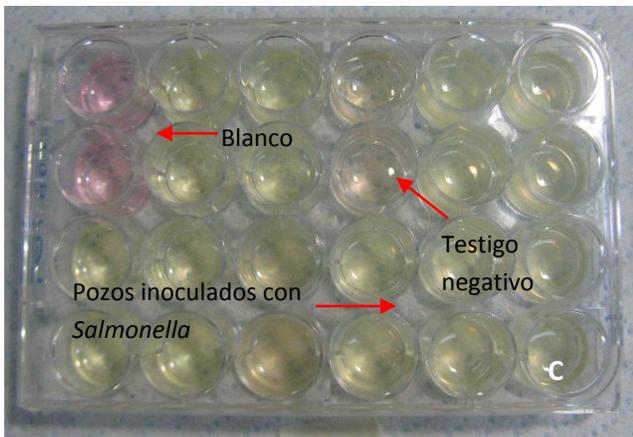
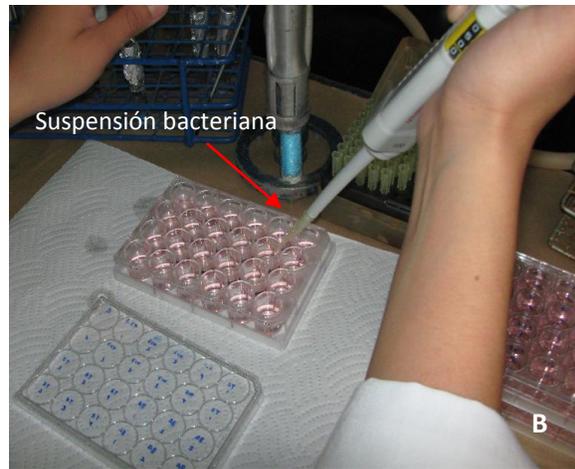
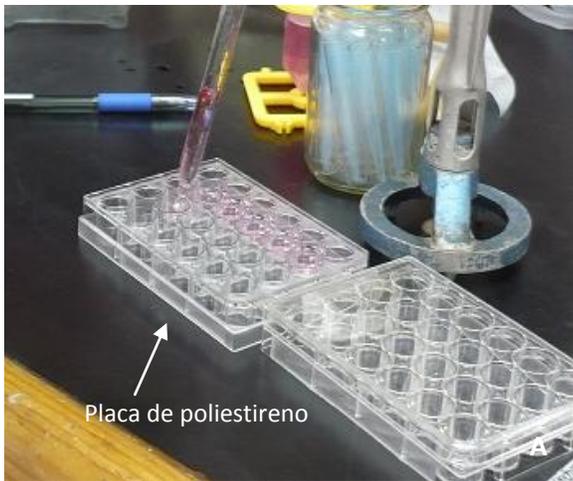


Figura 10. Preparación de placas poliestireno (Coster®) para la evaluación de biopelículas. A) Adición del medio esencial mínimo (MEM) con glucosa al 0.4% a los pozos de las placa. B) Inoculación de las placas con cepas de *Salmonella* sp. C) Placas de poliestireno inoculadas e incubadas a 37 °C por 72 h. D) Lavado de placas, después de ser teñidas con cristal violeta al 1%.



Figura 11. Suspensión de colorante en etanol (96%) a las celdas del espectrofotómetro Spectronic® (Genesys 2).



Figura 12. Fotocolorímetro-Vitek® usado para ajustar las suspensiones bacterianas según la escala de McFarland.



Figura 13. Preparación de tarjetas para corroborar la identidad de las cepas, en el sistema Vitek (Biomerieux®, Francia). A) Gradillas de Vitek®, con tarjetas y tubos de suspensión bacteriana. B) Vitek® para el llenado de las tarjetas con la suspensión bacteriana. C) Corte del conducto para separar la tarjeta. D) Introducción de tarjetas al equipo automatizado Vitek® para su análisis.

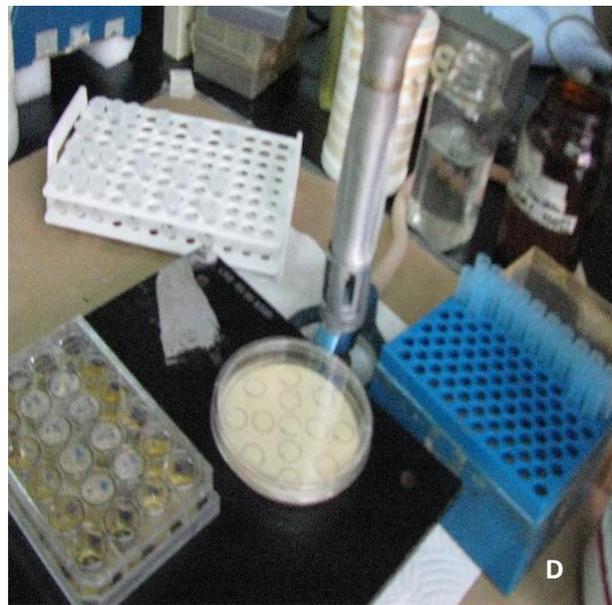
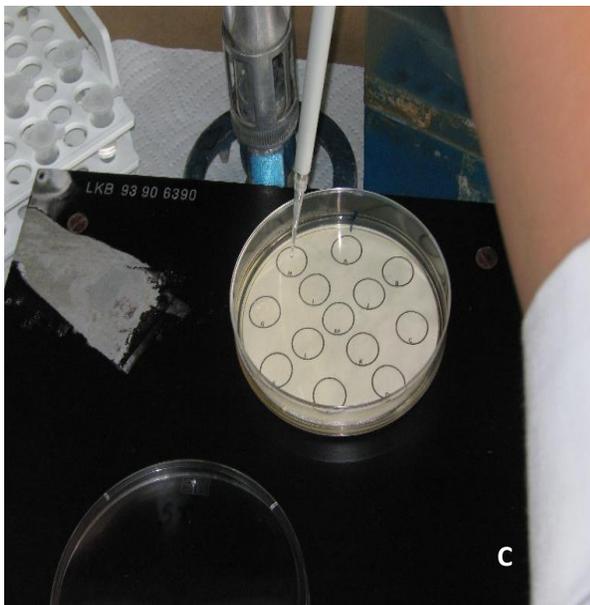
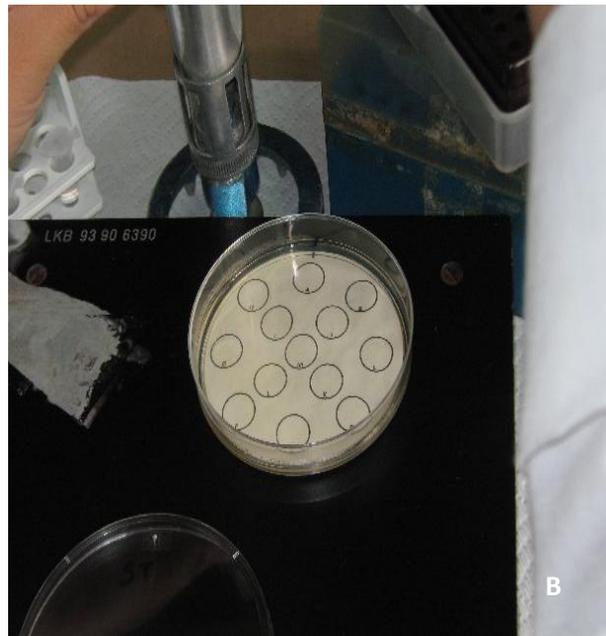
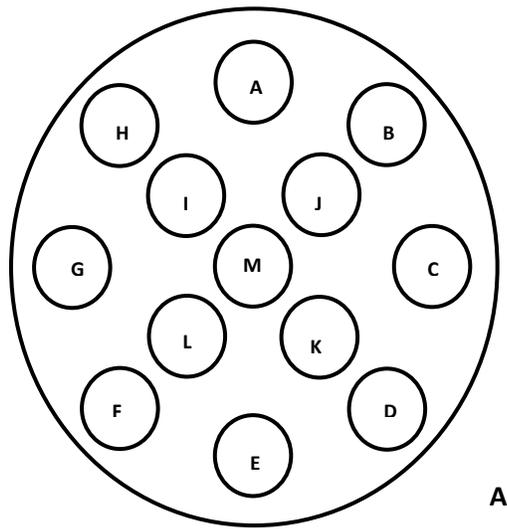


Figura 14. Etapas de la siembra en placa por la técnica de gota. A) Plantilla para la siembra en caja de Petri por la técnica de gota. B) Acomodo de la plantilla por debajo de la caja Petri con AST. C) Deposición del inoculo sobre el are definida de la placa. D) Secado de las cajas inoculadas sobre una superficie nivelada en condiciones de asepsia.

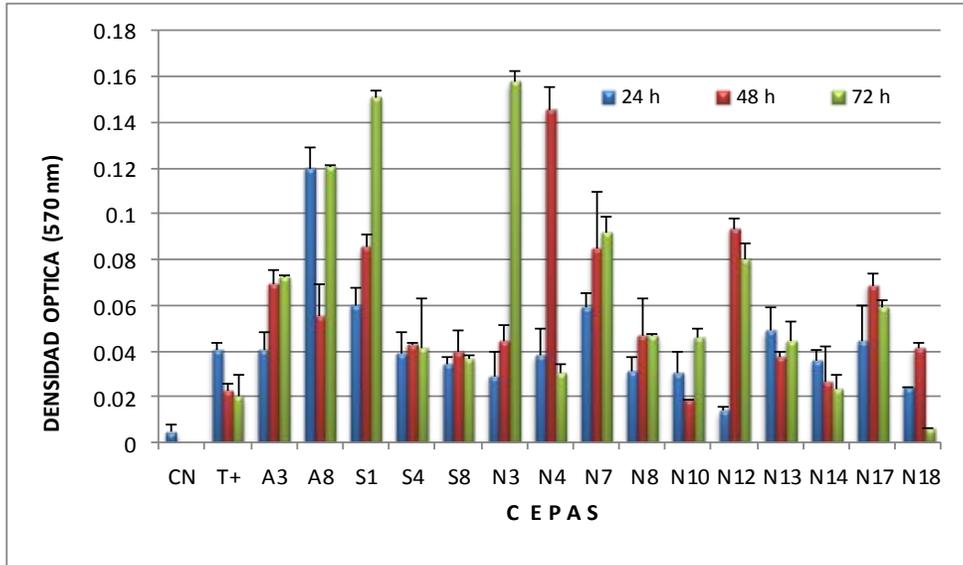


Figura 15. Primer ensayo, repetición uno. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos.

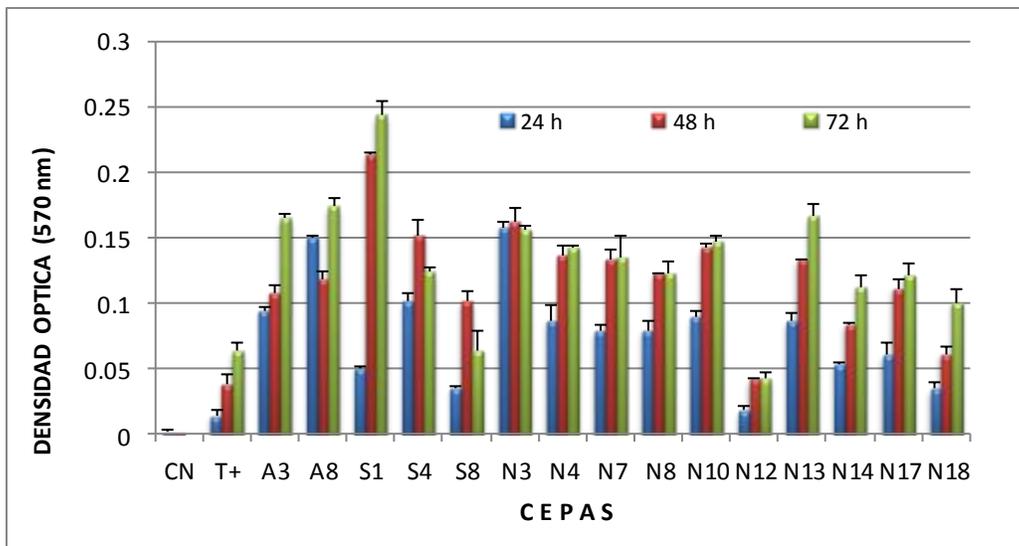


Figura 16. Primer ensayo, repetición dos. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos.

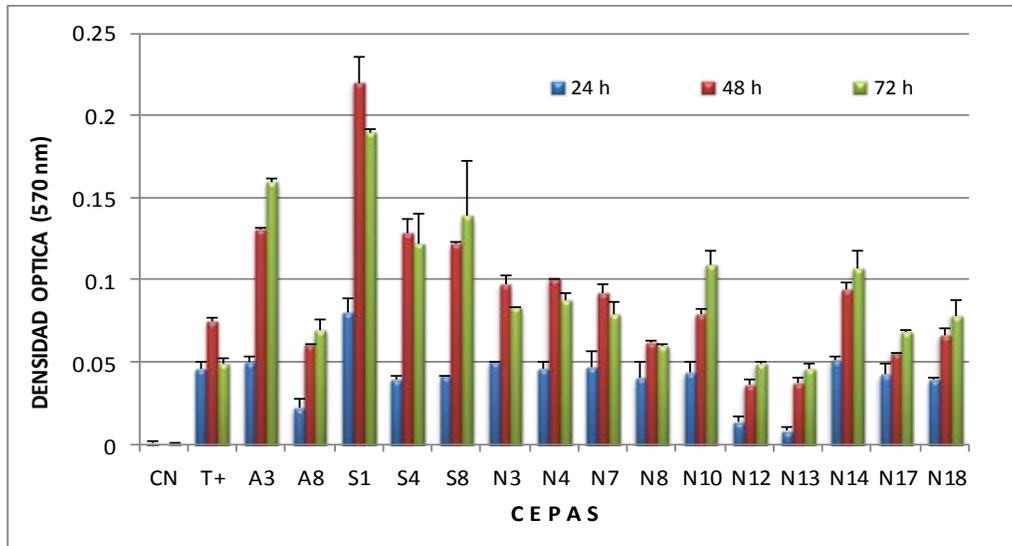


Figura 17. Primer ensayo, repetición tres. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos.

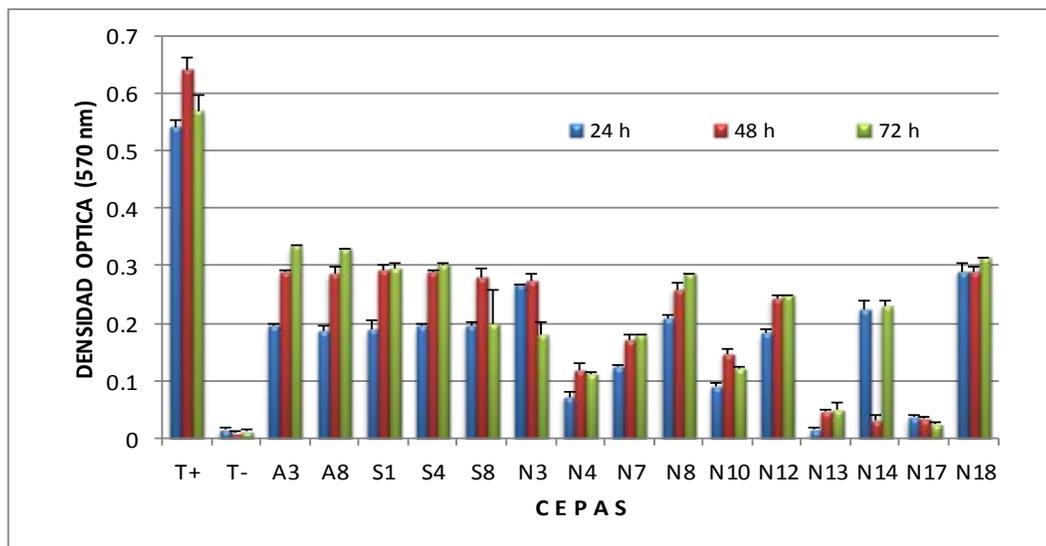


Figura 18. Segundo ensayo, repetición uno. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos.

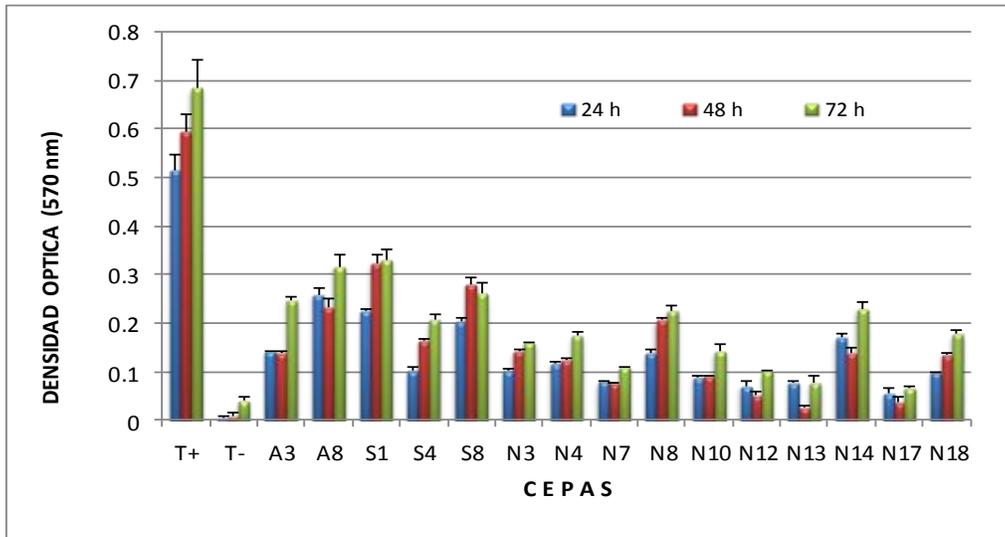


Figura 19. Segundo ensayo, repetición dos. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos.

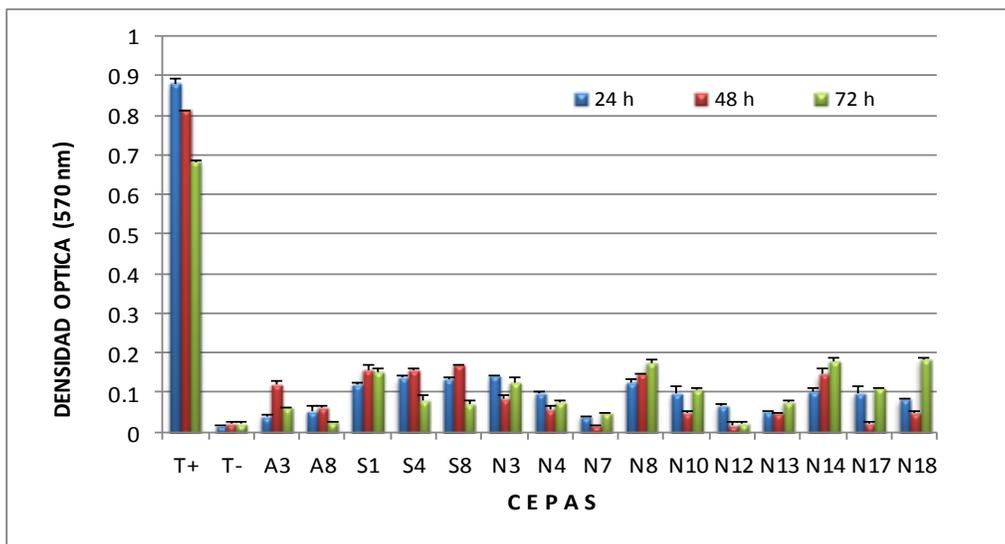


Figura 20. Segundo ensayo, repetición tres. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos.

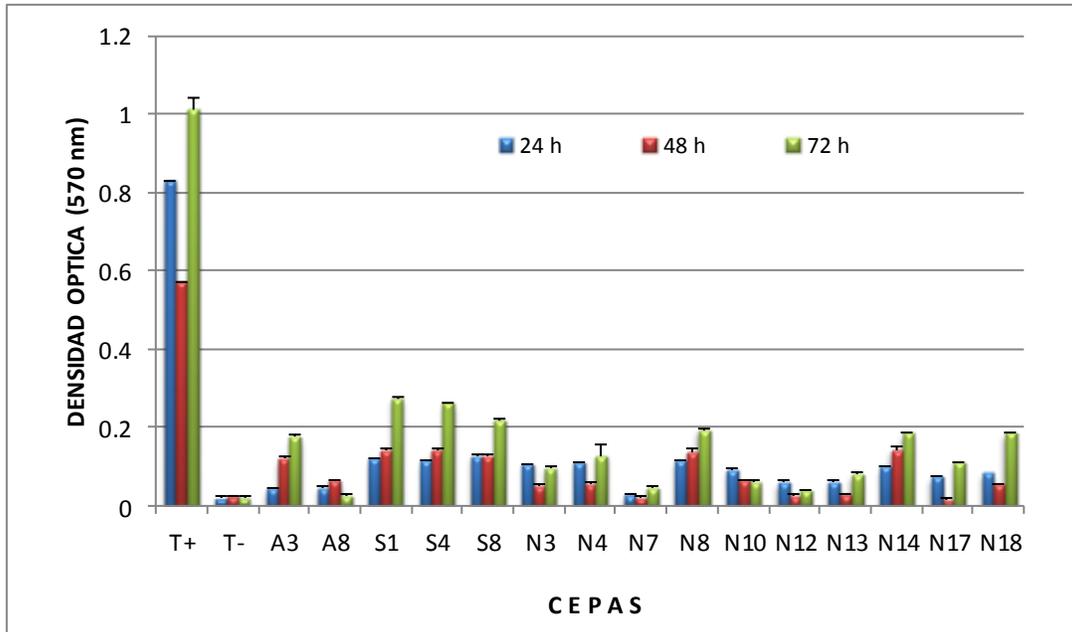


Figura 21. Segundo ensayo, repetición cuatro. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante de cepas de *Salmonella* en etanol (96%) registrados a diferentes tiempos.

ANEXOS

Medio agar sangre

500 ml de agar base sangre Bioxon®

25 ml de sangre de carnero desfibrada Hemo-provedores

Preparar el agar base sangre de acuerdo a las instrucciones del producto y esterilizar a 121 °C por 25 min. La sangre debe estar a 35 °C y mezclarla con el agar base sangre previamente colocado en baño María para bajar la temperatura a 40-50 °C (aproximadamente 1 hora) (Figura 7A y B). Disolver en la estufa (FISHER SCIENTIFIC) y con agitación lenta para evitar la formación de burbujas (Figura 7C) e inmediatamente después vaciar en placas (Figura 7D). Preparar el medio en condiciones de asepsia.

Medio de MEM simple

Medio MEM Gibco® 4.6 g

L- Glutamina In Vitro 5 ml

Bicarbonato Microlab (4.4 %) 5 ml

HEPES In Vitro (1 %) 5 ml

Agua estéril desionizada 485 ml

Disolver el medio MEM, enseguida la glutamina, después el carbonato y finalmente el HEPES (Figura 8A y B). La mezcla resultante se filtra con un sistema de filtración Millipore® con diámetro de poro de 0.22 µm, conectado a una bomba de vacío (Figura 8C y D). El recipiente se tapa y se coloca en una incubadora a 37 °C por 24 h, para verificar la esterilidad del medio. Después

de 24 h de incubación almacenar a 4 °C y adicionar la glucosa esterilizada previo a su utilización.

Glucosa al 4 %

Pesar 4 g de glucosa y mezclar con 96 mL de agua destilada. Posteriormente la solución se filtra con un filtro Millipore® desechable MILLEX® de 22 µm de diámetro (Figura 9), y se almacena a 5° C hasta su utilización.

Agar Soya Trypticaseína

Agar soya tripticaseína Difco 40 g

Agua destilada 1000 mL

Suspender el AST en el agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir por 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Enfriar a 45 °C, agitar y vaciar en cajas Petri estériles.

Agar MacConkey

Agar MacConkey Bioxon® 50 g

Agua destilada 1000 mL

Suspender los 50 g del medio en 1000mL de agua destilada, calentar y agitar frecuentemente hasta disolver por completo, hervir por 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos dejar enfriar y vaciar en placas estériles.

Agar entérico Hektoen

Agar entérico Hektoen Bioxon® 76 g

Agua destilada 1000 mL

Suspender el medio en el agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir por 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Enfriar agitar y vaciar en cajas Petri.

Caldo soya tripticaseína

Caldo soya tripticaseína Bioxon® 30 g

Agua destilada 1000 mL

Suspender 30 g del medio preparado en 1 L de agua, hasta diluirlo completamente, vaciar en los recipientes adecuados y esterilizar con tapas flojas a 121 °C por 15 min. Dejar enfriar y apretar tapas.

Cristal violeta

Cristal violeta SIGMA-ALDRICH 0.4 g

Agua destilada 40 mL

Disolver el cristal violeta en el agua destilada con en un matraz usando un agitador magnético. El líquido resultante se filtra con ayuda de un embudo y un papel filtro Whatman, la mezcla se vierte en un tubo Corning de 50 mL, nuevo y estéril.

Solución salina al 0.85%

Cloruro de sodio 8.5 g

Agua 1000 ml

Se disuelve el cloruro de sodio en el agua y se esteriliza a 121 °C por 15 minutos.

Escala de McFarland

Suspensión bacteriana		Contenido en mL	
por mL (x 10⁸)		Cloruro de bario (1%)	Ácido sulfúrico (1%)
1	3	0.1	9.9
2	6	0.2	9.8
3	9	0.3	9.7
4	12	0.4	9.6
5	15	0.5	9.5
6	18	0.6	9.4
7	21	0.7	9.3
8	24	0.8	9.2
9	27	0.9	9.1
10	30	1.0	9.0