

**Efecto del contenido de nutrientes y la
temperatura en desarrollo de biopelículas de
Listeria monocytogenes y *Salmonella* spp.**

Angie Gabriela Rubí Landaverde

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto del contenido de nutrientes y la
temperatura en desarrollo de biopelículas de
Listeria monocytogenes y *Salmonella* spp.**

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

Presentado por

Angie Gabriela Rubí Landaverde

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Efecto del contenido de nutrientes y la temperatura en desarrollo de biopelículas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp.

Angie Gabriela Rubí Landaverde

Resumen. *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. son patógenos que causan casos de enfermedades transmitidas por los alimentos que podrían conducir a la muerte y su capacidad de adherirse a las superficies en contacto con los alimentos está generando preocupaciones en la industria de alimentos. El propósito de este estudio fue evaluar usando un DCA, el efecto de temperatura y contenido de nutrientes sobre la capacidad de *L. monocytogenes* y *Salmonella* de adherirse a superficies de acero inoxidable (A-I) como primera fase en la formación de biopelículas. Se preparó un cóctel bacteriano de tres cepas de *L. monocytogenes* y un cóctel de cinco cepas de *Salmonella* spp. y se inoculó en superficies A-I (2×2cm²) contenidos en tubos de centrífuga con Caldo Soya Trypticosa (CST) fresco como fuente de nutrientes. Después de la inoculación, se incubaron durante 6 h para permitir la adherencia. El experimento se realizó a tres temperaturas diferentes 4, 21 y 37 °C, y cuatro concentraciones diferentes de nutrientes 3, 10, 20 y 30 g/L de CST para *L. monocytogenes* y 3, 10, 30 g/L para *Salmonella* spp. Después del período de adherencia, las superficies se enjuagaron con Solución Buffer de Fosfato (SBF) para descartar células no adheridas y luego se sumergieron en SBF para la extracción de la muestra. Se realizó dilución en serie y se sembraron en agares selectivos para cada microorganismo. La temperatura tuvo un efecto estadísticamente significativo (P<0,0001) en el número de células adheridas. Los resultados sugieren que estos patógenos se pueden adherir incluso si están en temperaturas de refrigeración y reciben una cantidad mínima de nutrientes.

Palabras clave: Acero inoxidable, adherencia, caldo soya tripticosa, patógenos.

Abstract. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. are serious foodborne pathogens that cause foodborne illness and may lead to death, its capability to attach to food contact surfaces is generating concern in food industries. The purpose of this study was to assess using a CRD, the effect of temperature and nutrient content on the ability of *L. monocytogenes* and *Salmonella* to attach to stainless-steel (S-S) surfaces as first step to form biofilms. A three-strain bacterial cocktail of *L. monocytogenes* and a five-strain cocktail of *Salmonella* spp. was prepared and inoculated into S-S coupons (2×2cm²) contained in centrifuge tubes with fresh Tryptic Soy Broth (TSB) as a source of nutrients. After inoculation, they were incubated for 6 h to allow for bacterial attachment. The experiment was performed at three different temperatures 4, 21, and 37 °C, and four different concentrations of nutrient availability 3, 10, 20, and 30 g/L of TSB for *L. monocytogenes* and 3, 10, 30 g/L for *Salmonella* spp. After the attachment period, coupons were rinsed with sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) solution to remove non-attached cells and then submerged in PBS for extraction of the attached cells. Extraction solutions were serially diluted and plated on selective agars for each microorganism. Temperature had a statistic significance effect (P<0.0001) in the number of attached cells. The results suggest that these pathogens can attach even if they are in refrigeration temperatures and receiving minimum amount of nutrient.

Key words: Attachment, foodborne pathogens, steel, tryptic soy broth

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
6. LITERATURA CITADA.....	15
7. ANEXOS	19

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de los cultivos de <i>Salmonella</i> spp. y <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2. Descripción de los tratamientos midiendo su efecto en la adherencia de células de <i>Listeria monocytogenes</i>	4
3. Descripción de los tratamientos midiendo su efecto en la adherencia de células de <i>Salmonella</i> spp.	4
4. Formulación del agar MOX selectivo para <i>Listeria monocytogenes</i>	6
5. Formulación del agar XLT4 selectivo para <i>Salmonella</i> spp.	6
6. Efecto de la temperatura y concentración de nutrientes en la adherencia de <i>Listeria monocytogenes</i> a superficies de acero inoxidable después de 6 h de contacto.	9
7. Efecto de la temperatura y concentración de nutrientes en la adherencia de <i>Salmonella</i> spp. a superficies de acero inoxidable después de 6 h de contacto	11
Figuras	Página
1. Dilución de 20 µl de muestra en 180 µl de agua peptona bufferada.	6
2. Ausencia de fimbrias en <i>L. monocytogenes</i> Scott A.	10
Anexos	Página
1. Valores estadísticos después de seis horas de adherencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en superficies de acero inoxidable.	19
2. Gráfico de cajas del efecto de concentración de nutriente y temperatura en la adherencia de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de acero inoxidable.	19
3. Valores estadísticos después de seis horas de adherencia de <i>Salmonella</i> spp. en superficies de acero inoxidable.	20
4. Gráfico de cajas del efecto de concentración de nutriente y temperatura en la adherencia de <i>Salmonella</i> spp. en superficies de acero inoxidable.	20

1. INTRODUCCIÓN

Las biopelículas están compuestas por microorganismos que se fijan a la superficie y que están rodeadas de una matriz polimérica extracelular, que es lo que les permite a las células agruparse. Esto es la clave para el desarrollo de una comunidad compleja y tridimensional de microorganismos. Una superficie puede actuar como una fuente de energía, de carbón orgánico, o como solo un material de soporte. Las biopelículas pueden estar formadas de una sola especie, pero en su naturaleza están conformadas de diferentes especies bacteriológicas (Sauer *et al.* 2007).

La formación de una biopelícula comienza con la adhesión de las células a una superficie. La adhesión se inicia con una interacción débil entre las células bacterianas y la superficie, esto es comúnmente conocido como adhesión reversible, lo que conlleva a un siguiente paso que es una fuerte adhesión entre éstos que se conoce como adhesión irreversible. Las células a medida van creciendo y dividiéndose van generando una sustancia polimérica extracelular que contiene polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos; siendo todo esto lo que protege y le da estabilidad a la biopelícula (Tandoga *et al.* 2017).

Listeria monocytogenes, *Salmonella* spp. y otros patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* son conocidos por adherirse a superficies abióticas como el acero inoxidable, plástico, vidrio y cemento (Jun *et al.* 2009). En las industrias es de interés que no ocurra una adherencia de las células bacterianas a una superficie metálica ya que esto resulta en biocorrosión y logra dañar las líneas de tuberías lo cual representa un gasto de millones de dólares por reparaciones (Palmer *et al.* 2007). Hoy en día, las industrias alimentarias suman a su lista de cuidados que no ocurra adherencia de patógenos transmitidos por alimentos en las superficies con mayor contacto a los alimentos por motivos de salud pública además de económicos al verse obligados a hacer remplazos de materiales por biocorrosión.

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva que puede causar una infección peligrosa llamada listeriosis, que puede llevar a condiciones graves de la enfermedad, tales como septicemia, encefalitis, meningitis, abortos y muertes (FDA 2012a). *L. monocytogenes* puede crecer en presencia de altas condiciones de sal o temperaturas de refrigeración, permaneciendo viable en diversos productos alimenticios hasta el final de su vida útil (Camargo *et al.* 2017). Este patógeno es una amenaza de alta importancia para la contaminación de alimentos listos para el consumo, durante su procesamiento; puede adherirse con mayor fuerza a los polímeros que otros patógenos, motivo por el cual es de interés el estudio de su capacidad de adherencia en superficies de contacto con alimentos ya que presentaría riesgo de formación de biopelículas (Alonso *et al.* 2017).

Listeria monocytogenes es responsable de ~ 19% de los casos de enfermedades transmitidas por los alimentos que conducen a la muerte en los EE. UU (Scallan *et al.* 2011), mientras que su presencia en productos alimenticios es una causa importante de retiros de alimentos en todo el país. Este patógeno tiene la capacidad de formar biopelículas, que es una comunidad sésil de microorganismos incrustados en una matriz auto producida de sustancias poliméricas extracelulares (Colagiorgi *et al.* 2016). La condición ambiental que rodea a la bacteria es lo que influye para multiplicarse y sobrevivir, como la temperatura, actividad del agua, condiciones de sal, entre otros. Informes técnicos describen que *L. monocytogenes* puede multiplicarse en una amplia gama de condiciones de crecimiento durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, por ejemplo, a temperaturas tan bajas como -0.4 °C (Zhu *et al.* 2017).

La formación de biopelículas por *L. monocytogenes* es un problema grave de inocuidad alimentaria para todas las industrias alimentarias, ya que es capaz de adherirse a muchas superficies en contacto con alimentos como el acero inoxidable, el poliestireno y el vidrio (Colagiorgi *et al.* 2017). Los estudios han demostrado que las biopelículas pueden sobrevivir a desinfectantes que están a concentraciones comúnmente utilizadas en el entorno industrial (Fagerlund *et al.* 2017).

Salmonella spp. es una bacteria Gram negativa, causa dos tipos de enfermedades que son gastrointestinales y tifoideas. Este patógeno está ampliamente disperso en la naturaleza, aunque en el pasado se asoció con productos de origen animal, ahora se encuentra en productos frescos. Este microorganismo puede sobrevivir en alimentos con poca humedad, como las especias (FDA 2012b). Según informes anteriores, *Salmonella* spp. puede permanecer en superficies y equipos utilizados para manipular y lavar carne cruda, siendo la limpieza y el saneamiento convencional insuficiente para erradicar *Salmonella* spp. (Corcoran *et al.* 2014).

Las plantas procesadoras de alimentos han sido conscientes de mantener un estricto control en sus condiciones de procesamiento para mantener la seguridad alimentaria, ya que *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. son patógenos capaces de fijarse y crecer dependiendo de las condiciones ambientales que están rodeando la bacteria. Es importante optimizar el proceso de limpieza y desinfección de las instalaciones de procesamiento a fin de reducir la posibilidad de que ambos patógenos se adherirán a una superficie de contacto con alimentos como el acero inoxidable y así evitar el desarrollo de biopelículas. El patógeno puede crecer y formar una biopelícula incluso si está recibiendo una mínima cantidad de nutrientes, estando en temperatura ambiente, refrigeración, y del cuerpo humano. El objetivo de esta investigación es:

- Determinar el efecto de la temperatura y niveles de concentración de nutrientes en la adherencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en superficies de acero inoxidable.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio.

El estudio se realizó en Lubbock, Texas, Estados Unidos, en la Universidad de Texas Tech. Toda la preparación de materiales, inoculación, incubación y análisis de datos se hicieron en el laboratorio de microbiología de alimentos del Departamento de Ciencia Animal y Ciencia de los Alimentos dentro de la Universidad.

Activación de cultivos.

Tres días previos a realizar el experimento, tres cepas de *L. monocytogenes* (Cuadro 1) se aislaron por separado en Agar Modificado Oxford (MOX), y cinco cepas de *Salmonella* (Cuadro 1) en Agar Xilosa Lisina Tergitol 4 (XLT4), los cuales fueron obtenidos del inventario de cepas comercialmente disponibles de la empresa American Type Culture Collection (ATCC por sus siglas en ingles), los cuales eran mantenidos por el Centro Internacional para la Excelencia en la Industria de Alimentos (ICFIE por sus siglas en ingles). Ambos medios son selectivos diferenciales para el aislamiento de dichos microorganismos. Con asa estéril de 10 µl se tomó una alícuota del cultivo el cual estuvo preservado en congelación a -80 °C, y se realizó un estriado en platos Petri. Estos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas. Luego se seleccionó una colonia aislada de cada cepa y se inoculó en 9 ml de caldo soya tripticasa seguido por incubación de 37 °C por 24 horas. Se continuo con un segundo pase de la bacteria al cumplirse las 24 horas, se tomó 1 ml del inóculo y se pasó a 9 ml de caldo fresco y se incubó a 37 °C. Transcurridas 21-24 horas se mezclaron los cultivos de cada cepa y así se obtuvo el coctel de tres cepas de *L. monocytogenes* y el coctel de cinco cepas de *Salmonella* spp. En el cuadro 1 se detalla la procedencia de cada cepa.

Cuadro 1. Descripción de los cultivos de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

Microorganismo	Nombre	Procedencia	Serotipo
<i>L. monocytogenes</i>	Li 2109	Pollo, Inglaterra	4e
<i>L. monocytogenes</i>	Petite Scott A	Cepa ya existente	4b
<i>L. monocytogenes</i>	F5069	Leche, Massachusetts	No identificado
<i>Salmonella</i> spp.	SAG 41017-801	Granja	Infantis
<i>Salmonella</i> spp.	SAG 8817807	Granja	Infantis
<i>Salmonella</i> spp.	21430	Planta de pollo	Infantis
<i>Salmonella</i> spp.	21423	Planta de pollo	Infantis
<i>Salmonella</i> spp.	ATCC 14028	Corazones e hígados de pollos con 4 semanas de edad	Typhimurium

Preparación de las concentraciones de nutrientes.

La preparación comercial del caldo soya tripticasa recomienda utilizar 30g/L. En este estudio además de utilizar la concentración comercial, para *L. monocytogenes*, se prepararon las concentraciones de 20, 10 y 3 g/L (cuadro 2) y para *Salmonella* spp. 10, 3 g/L (cuadro 3). Se distribuyeron 18 ml de cada concentración en tubos de centrifugación de 50 ml estériles. También se preparó solución buffer de fosfato para hacer enjuague a la lámina de acero inoxidable y para hacer la extracción de células.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos midiendo su efecto en la adherencia de células de *Listeria monocytogenes*.

	Temperatura		
	4 °C	21 °C	37 °C
Nutriente	3 g/L	3 g/L	3 g/L
	10 g/L	10 g/L	10 g/L
	20 g/L	20 g/L	20 g/L
	30 g/L	30 g/L	30 g/L

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos midiendo su efecto en la adherencia de células de *Salmonella* spp.

	Temperatura		
	4 °C	21 °C	37 °C
Nutriente	3 g/L	3 g/L	3 g/L
	10 g/L	10 g/L	10 g/L
	30 g/L	30 g/L	30 g/L

Inoculación de las bacterias en la superficie de acero inoxidable.

Se utilizaron cupones de acero inoxidable ($2 \times 2 \text{ cm}^2$), previamente lavados en el equipo Ultrasonico de la marca VWR. El cual realiza un lavado eficiente utilizando la técnica de cavitación que elimina la grasa localizada mediante el uso de ultrasonidos que van de 15-400 kHz, en un periodo de 20 minutos sumergiendo las muestras de material en agua a una temperatura entre 65 y 80 °C. Se utilizó una solución de detergente alcalino de múltiples usos. Las láminas se enjuagaron tres veces con agua purificada por ósmosis inversa. Después fueron esterilizadas a 121 °C durante 30 minutos en un equipo de autoclave. Utilizando pinzas estériles se colocó una lámina por cada tubo que contenía los 18 ml de caldo soya tripticasa para inducir la adherencia de células. Se inocularon con 1 ml del coctel bacteriológico (10^9 UFC/ml) obteniendo un volumen total de 19 ml en el tubo conteniendo la lámina. Se procedió con el tiempo de incubación a tres temperaturas que fueron 4, 21 y 37 °C por 6 horas.

Preparación de las muestras.

Después del periodo de incubación de 6 horas, las láminas se extrajeron de los tubos con pinzas estériles, pasándolo a un segundo tubo con 40 ml de solución buffer de fosfato con el propósito de hacer enjuague para que las células que no lograron adherirse sean removidas. La lámina se colocó en un tercer tubo de centrifugación con 10 ml de solución buffer de fosfato y se realizó agitación por medio de vortex por un minuto para desprender las células que se fijaron en la superficie y así quedaran dispersas en la solución donde pueden ser cuatificadas. Se utilizaron placas de 96 pocillos para realizar la dilución previa a la siembra, en la parte superior de la placa (figura 1, fila A) se colocaron 200 μl de la solución de extracción de cada tubo de centrifugación que contenía la lámina. Se rellenó el resto de los pocillos (fila B-H) con 180 μl de agua peptona bufferada. Utilizando una pipeta multicanal con puntas estériles de 20 μl , se realizaron diluciones seriales con factor 1:10, tomando de la muestra en fila A y transfiriéndolo a la siguiente fila. Para homogenizar la muestra se realizó una suspensión, bajando y subiendo tres veces la muestra. Entre cada dilución de fila se cambiaron las puntas de pipeta (Chen *et al.* 2003). Se tomaron 10 μl de cada dilución y se sembró en los medios de cuantificación selectivos para *L. monocytogenes* que fue MOX (Cuadro 4) y para *Salmonella* spp. en XLT4 (Cuadro 5) utilizando el método de goteo en placa. Se esperó que la gota se secara en los platos para la incubación a 37 °C por 16-24 horas.

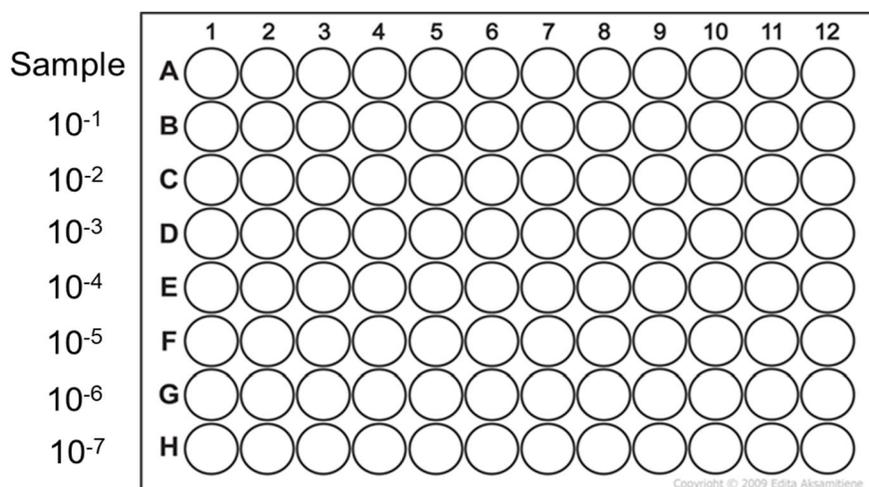


Figura 1. Dilución de 20 µl de muestra en 180 µl de agua peptona bufferada.
Fuente modificada: Runnerswebsite 2018.

Cuadro 4. Formulación del agar MOX selectivo para *Listeria monocytogenes*.

Formula típica	g/litro
Agar	15.30
Cloruro de litio	15.00
Caseína por digestión pancreática	8.90
Peptona proteasa No.3	4.40
Extracto de levadura	4.40
Cloruro de sodio	4.40
Tripticasa por digestión corazón de res	2.70
Esculina	1.00
Almidón	0.90
Citrato de amonio férrico	0.50

Fuente Difco 2009a.

Cuadro 5. Formulación del agar XLT4 selectivo para *Salmonella* spp.

Formula típica	g/litro
Agar	18.00
Lactosa	7.50
Sacarosa	7.50
Tiosulfato de sodio	6.80
L-Lisina	5.00
Cloruro de sodio	5.00
Xilosa	3.75
Extracto de levadura	3.00
Proteasa peptona No. 3	1.60
Citrato de amonio férrico	0.80
Rojo fenol	0.08

Fuente Difco 2009b.

Cuantificación de adherencia.

En la cuantificación, se colocó de cada dilución tres alícuotas de 10 µl para *L. monocytogenes* obteniendo 24 gotas por plato; y dos alícuotas de 10 µl de cada dilución para *Salmonella* spp teniendo 16 gotas por plato. El conteo se realizó en la dilución que tuviera un rango de 5-50 colonias por gota. Se calculó el promedio de colonias y se multiplicó por el factor de dilución en el que se tomó para sacar UFC/ml. Considerando que las soluciones de extracción eran de 10 ml, esto se multiplicó por el dato de UFC/ml para calcular cuántos UFC fueron extraídos de ese volumen. Se tomó en cuenta el área total de la lámina de acero inoxidable, para calcular las células adheridas expresadas en UFC/cm². El resultado obtenido fue transformado a unidades logarítmicas para corrección en la varianza de los datos, por lo que las unidades son reportadas como log UFC/cm².

Diseño experimental y análisis estadístico.

Para evaluar la capacidad de las células de los patógenos *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. de adherirse a la superficie de acero inoxidable, se usó un diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial de 3×4 para *L. monocytogenes* obteniéndose un total de 12 tratamientos, y de 3×3 para *Salmonella* spp. para un total de 9 tratamientos. El factor A correspondió a la temperatura (4, 21, 37 °C) para ambos patógenos, y el factor B correspondió a la concentración de nutrientes (3, 10, 20, 30 g/L) para *Listeria monocytogenes*, y para *Salmonella* spp. (3, 10, 30 g/L). Se evaluó el efecto de cada factor independiente y su interacción (A*B).

Se hizo un Análisis de Varianza para determinar si hubo diferencia significativa entre cada factor evaluado, y se usó una separación de medias Duncan para determinar las diferencias entre tratamientos. Se realizó un análisis de medias ajustadas LS MEANS. El grado de significancia del experimento fue de 95% (P< 0.05). El análisis estadístico se realizó con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4®).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la fijación de células de *Listeria monocytogenes*.

Los factores evaluados en este estudio demostraron ser importantes para la fijación de células de *L. monocytogenes* en las láminas de acero inoxidable: concentración de nutriente ($P = 0.0091$), y temperatura ($P < 0.0001$). Considerando las condiciones ambientales como la temperatura, *L. monocytogenes* es un microorganismo mesófilo con característica de psicrófilo facultativo. Se observó que a cada nivel de temperatura se obtuvo adherencia. De acuerdo a estudios anteriores con temperaturas muy cercanas a las de este estudio, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ la bacteria no presenta un flagelo, a $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ sí hay presencia de un flagelo, mientras que a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ es una temperatura de refrigeración para alimentos en la cual el microorganismo se encuentra en un estado estacionario (Bonsaglia *et al.* 2013).

Según los resultados expresados en el cuadro 6, realizando una comparación de medias entre cada tratamiento, se puede observar que a la temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la concentración de nutrientes de 3 g/L , la cantidad de células adheridas aumenta. Si lo comparamos con la temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con la concentración de 30 g/L el promedio va de 4.83 a $6.08\text{ log}_{10}\text{ UFC/cm}^2$. Existe una interacción significativa ($P < 0.016$) entre cantidad de nutrientes con temperatura.

De acuerdo a estudios similares donde se evalúan en la cepa ATCC 19111, con temperaturas y dilución de nutrientes diferentes a las de este estudio. Concluyen que hay mayor adherencia en presencia de un medio rico de nutrientes, donde la temperatura más alta fue la de menor adherencia (Mai y Conner 2007). Sin embargo, hay un factor diferente en este estudio que es la mezcla de varias cepas, que confiere un resultado diferente a la interacción que existe entre la concentración de nutrientes con la temperatura.

La adhesión bacteriana en una superficie biótica como es el acero inoxidable dependerá de varios factores, como las propiedades fisicoquímicas y estructura de la superficie de la bacteria. Al igual que dependerá del tipo de superficie que está en contacto con el alimento (carne, plantas, tipo de tejido y su edad, grasa), de las condiciones ambientales (temperatura, pH y condiciones del medio) (Giaouris y Nesse 2015). Diversos estudios revelan que los factores que podrían estar relacionados con la adherencia y la formación de biopelículas tiene que ver con la producción de sustancias poliméricas extracelulares y la eficiencia de transporte que tiene por toda la membrana externa, la expresión del flagelo, la regulación de enzimas ribonucleicas y proteínas unidas al ARN (Kim y Wei 2009).

Los resultados explican que existe una rápida transición de células planctónica a sésiles en una condición ambiental de baja disponibilidad de nutrientes con una alta temperatura. Estudios han demostrado que la temperatura afecta las propiedades de las superficies al ser

hidrófilas, que a bajas temperaturas son alteradas y cambian la habilidad de las bacterias de adherirse a materiales hidrofóbicos como el acero inoxidable (Speranza *et al.* 2011).

Cuadro 6. Efecto de la temperatura y concentración de nutrientes en la adherencia de *Listeria monocytogenes* a superficies de acero inoxidable después de 6 h de contacto.

Concentración de CST (g/L)	Recuentos de <i>L. monocytogenes</i> (UFC/cm ²)			
	4 °C	21 °C	37 °C	Promedio
3	5.02 ± 0.29 ^{aX}	4.89 ± 0.49 ^{aX}	6.08 ± 0.33 ^{bX}	5.33 ± 0.53 ^X
10	4.98 ± 0.29 ^{aX}	4.56 ± 0.43 ^{bY}	5.62 ± 0.54 ^{cY}	5.05 ± 0.44 ^X
20	5.11 ± 0.27 ^{aX}	4.87 ± 0.56 ^{aY}	5.52 ± 0.29 ^{bY}	5.17 ± 0.27 ^{XY}
30	4.83 ± 0.35 ^{aX}	4.89 ± 0.54 ^{aY}	5.49 ± 0.32 ^{bY}	5.07 ± 0.30 ^Y
Promedio	4.99 ± 0.10 ^b	4.80 ± 0.14 ^c	5.68 ± 0.24 ^a	

CST Caldo soya tripticasa

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de 12 observaciones.

^{abc} Promedios con letras minúsculas distintas en cada columna denotan diferencia entre temperatura (P < 0.05)

^{XYZ} Promedios con letras mayúsculas distintas en cada fila denotan diferencia entre concentraciones de nutriente (P < 0.05)

Se observó una diferencia significativa con la adherencia a la temperatura de 37 °C, el cuadro 6 detalla que esta tuvo una adherencia mayor en comparación con las de 21 y 4 °C. Smoot y Pierson encontraron que el número de células adheridas en acero inoxidable, aumenta a medida la temperatura va aumentando (Smoot y Pierson 1998). De acuerdo a la literatura, existen cambios en las estructuras superficiales como lo es el flagelo que contribuye a que la célula se adhiera. El efecto que puede tener esta temperatura es por los cambios que resultan en niveles más bajos de unión celular cuando las células crecen a 37 °C también permiten que estas se desprendan desde la superficie más fácilmente ya que no se presenta un flagelo que les permite mantenerse adheridas, y esto género que sea un conteo mayor en este factor (Vatanyoopaisarn *et al.* 1999). Para este estudio se observó que la temperatura 21 °C obtuvo menos conteo de células adheridas, se debe de tomar en cuenta que se utilizó un coctel de tres cepas, la cual cada una tiene un mecanismo de acción diferente, por lo que se asume que para los resultados de este experimento las reacciones dependieron según las cepas. Contrastando esto con los resultados de Kalmokoff *et al.* la cepa Scott A se adhirió menos a temperatura ambiente, en su estudio esta cepa demuestra tener características de adhesión muy pobres, posee un nivel inferior de fimbrias (Figura 2) (2008).

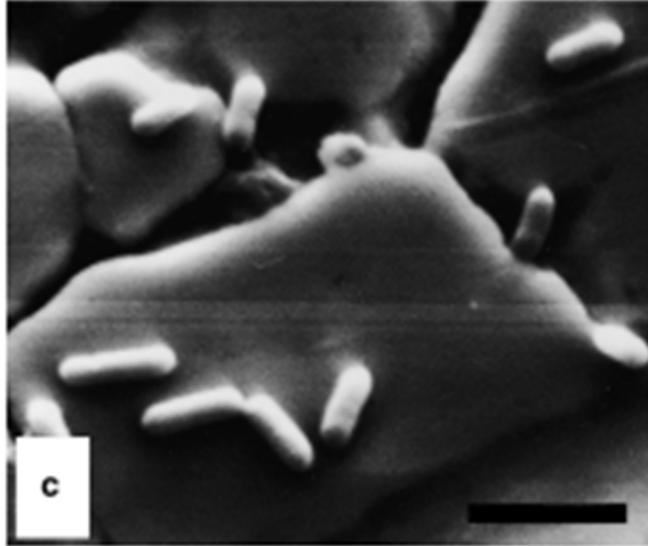


Figura 2. Ausencia de fimbrias en *L. monocytogenes* Scott A.
Fuente: Kalmokoff *et al.* 2008.

Las fimbrias son apéndices en la pared celular de la bacteria, están formadas de proteínas que contienen aproximadamente 163 amino ácidos. Estudios científicos relacionan a las fimbrias como un factor que permite que las bacterias tengan la habilidad de adherirse (Jonson *et al.* 2005).

La concentración de nutrientes de 3, 10 g/L no son significativamente diferentes entre sí, sin embargo, son los que mostraron una media de adherencia mucho más alta que las demás concentraciones a la temperatura de 37 °C. Esto demuestra que los nutrientes están jugando un papel importante en la fijación de estas células a la temperatura de 37 °C. Según estudios, existe la hipótesis de que las células al no tener suficientes nutrientes entran a un estado de estar muriendo de hambre y estas se desprenden fácilmente de la superficie, provocando la liberación de las células microbianas y que estas se vayan quedando pegadas en la matriz polimérica haciendo que la biopelícula vaya diseminándose (Hunt *et al.* 2004).

L. monocytogenes contiene una proteína en su superficie llamada internalina A, la cual contiene 800 aminoácidos que le permite invadir las células epiteliales intestinales. Mutaciones en el gen de esta proteína es lo que le ha conferido a *L. monocytogenes* que se pueda adherir a superficies que estén en contacto con procesamiento de alimentos. De acuerdo a estudios previos, no importa la concentración de nutrientes a la que se exponga el patógeno, porque los niveles de internalina A no se ven afectados (Gilmartin *et al.* 2016).

Evaluación de la fijación de las células *Salmonella* spp.

Según los valores observados en el cuadro 7, se puede afirmar que la interacción de nutriente con temperatura es significativa ($P = 0.0094$), al observar que hay una mayor adherencia a la temperatura 21 °C con la concentración de nutriente más alta que es 30 g/L,

en comparación con la misma concentración a una temperatura diferente que es 4 °C que presenta una adherencia menor a todos.

Considerando que este microorganismo es Gram negativo, sus variables significativas a ser evaluadas tuvieron un resultado muy distinto al de *L. monocytogenes*. La cantidad de nutrientes no tienen un efecto significativo ($P = 0.2892$) en la adherencia de las células. Mientras que la temperatura sí demostró tener un efecto estadísticamente significativo ($P < 0.0001$), el cual se puede comparar con el resultado de estudios anteriores donde determinan que este microorganismo se adhiere con más intensidad a temperatura ambiente de 21°C que a la de 37 °C (Osorio Rodríguez 2014).

El cuadro 7 detalla los conteos de adherencia que son significativamente diferentes entre temperaturas, teniendo como un resultado alto a 21°C. La media de los nutrientes es estadísticamente igual su conteo. Si contrastamos estos resultados con estudios anteriores, donde se han determinado que gran parte de las cepas de *Salmonella* spp. producen más biopelícula en condiciones carentes de nutrientes, sobre superficies de plástico (Stepanovic *et al.* 2004). En este estudio se determina que la mezcla de cepas que se utilizaron tuvieron un efecto más estable que les permitió adherirse sin importar la concentración de nutrientes.

Cuadro 7. Efecto de la temperatura y concentración de nutrientes en la adherencia de *Salmonella* spp. a superficies de acero inoxidable después de 6 h de contacto.

Concentración de CST (g/L)	Recuentos de <i>Salmonella</i> spp (UFC/cm ²)			
	4 °C	21 °C	37 °C	Promedio
3	5.31 ± 0.39 ^{aX}	6.41 ± 0.35 ^{bX}	5.73 ± 0.38 ^{cX}	6.51 ± 0.46 ^X
10	5.04 ± 0.37 ^{aX}	6.47 ± 0.36 ^{bX}	5.47 ± 0.28 ^{cX}	6.37 ± 0.54 ^X
30	4.76 ± 0.32 ^{aX}	6.84 ± 0.36 ^{bX}	5.40 ± 0.19 ^{cX}	6.08 ± 0.88 ^X
Promedio	5.73 ± 0.30 ^c	7.19 ± 0.0921 ^a	6.05 ± 0.32 ^b	

CST Caldo soya triptícasea

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de 9 observaciones.

^{abc} Promedios con letras minúsculas distintas en cada columna denotan diferencia entre temperatura ($P < 0.05$)

^{XYZ} Promedios con letras mayúsculas distintas en cada fila denotan diferencia entre concentraciones de nutriente ($P < 0.05$)

Este microorganismo tiene la habilidad de detectar, adaptarse y responder a una diversidad de condiciones ambientales a las que se expone. Esta bacteria es conocida por adherirse a superficies abióticas y bióticas. Componentes en la matriz de su biopelícula tales como las fimbrias y celulosa juegan un papel importante en la sobrevivencia de *Salmonella* en condiciones extremas del ambiente que le rodea. La deficiencia de celulosa no afecta la virulencia de *Salmonella*, pero incrementa la sensibilidad a tratamientos con cloro, lo que alerta que la formación de biopelículas es un factor importante en su sobrevivencia en superficies (Solano *et al.* 2002). Las fimbrias son apéndices proteicos presentes en la superficie de ciertas bacterias. Estas son consideradas hidrofóbicas por el hecho que la

proteína del pili está compuesta de aproximadamente 30% o más de amino ácidos hidrofóbicos por ende aumenta la hidrofobia superficial cuando las fimbrias están presentes (Phuong Tam 2006).

Importancia del estudio.

Ambos microorganismos representan una amenaza para la salud humana. Más del 75% de los casos atribuidos por *Salmonella* spp. están relacionados con siete categorías de tipos de alimentos como vegetales que contengan semillas, huevos, pollo, cerdo, res, frutas y otros procesados. Mientras que con *Listeria monocytogenes* sus casos se han relacionado con dos categorías de alimentos, productos lácteos y frutas (CDC 2017). Por lo tanto, para las industrias alimentarias esto representa puntos críticos que deben controlar con más cuidado en el procesamiento de sus alimentos, no solo por el hecho de que tengan que ver la situación legal y económica a la que se involucrarían, si no que por proteger la salud de sus consumidores.

Este estudio demostró que estos patógenos son capaces de adherirse a una temperatura de refrigeración como 4 °C, a temperatura ambiente que generalmente es a la que una planta procesadora opera como 21 °C, y finalmente la temperatura del cuerpo humano que es 37 °C, donde aseguramos que estos patógenos incluso se adhieren a nuestras células epiteliales. Considerando cada concentración de nutriente que se utilizó para este estudio, se demostró que sin importar donde se haya cuantificado más adherencia, estos microorganismos aun así se pueden fijar, aunque estén con una mínima concentración de nutrientes. Es por esto que las empresas procesadoras deben de tomar medidas en cuanto a su proceso de sanitización y limpieza, que reduzca la probabilidad de que ocurra una adherencia de estos patógenos y conlleve a la formación de biopelículas que se vuelven en una lucha constante para erradicar la contaminación en las superficies que están en contacto con los alimentos.

4. CONCLUSIONES

- *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* son capaces de adherirse a una superficie de acero inoxidable y llegar a formar una biopelícula en un período de 6 horas si se encuentran dentro del rango de concentración de nutrientes y temperatura evaluados en esta investigación.
- *L. monocytogenes* presentó en general mayor adhesión a 37 °C que a las otras temperaturas utilizadas, se observó una mayor adherencia cuando la cantidad de nutrientes era limitada solo a la temperatura de 37 °C, pero en las temperaturas de 4 y 21 °C la concentración de nutrientes probada no tuvo efecto significativo.
- La temperatura en *Salmonella* spp. tiene un efecto en cuantas células se adhieren a la superficie. La diferencia de disponibilidad de nutrientes a la que está expuesta no representa un efecto significativo dentro del rango evaluado en esta investigación.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar el mismo estudio utilizando una superficie de un material distinto que también esté relacionado con el procesamiento de alimentos, y medir la influencia de la hidrofobicidad de estos en cuanto a la adherencia de estos microorganismos.
- Evaluar la adherencia aplicando diferentes intervenciones de soluciones limpiadoras y desinfectantes comúnmente utilizados en las plantas procesadoras, para medir la efectividad de estos y si reduce la probabilidad de formar biopelículas.
- Evaluar la formación de biopelículas con los mismos factores ya evaluados, con el uso de un biorreactor para determinar si existe el mismo comportamiento a un tiempo más prolongado (24 o 48 horas).
- Evaluar los mismos factores, utilizando una fuente de nutrientes diferente como ser líquidos de alimentos que están asociados a la fácil contaminación de estos microorganismos que han generado casos epidémicos.
- Realizar el estudio con otros microorganismos de interés en alimentos como *E.coli* O157:H7 o *Pseudomonas aeruginosa*.

6. LITERATURA CITADA

Alonso A, Perry K, Regeimbal J, Regan P, Higgins D. 2017. Identification of *Listeria monocytogenes* determinants required for biofilm formation. *Plos One*.17(9):12. doi.org/10.1371/journal.pone.0113696

Bonsaglia E, Silva N, Fernandes A, Araujo J, Tsunemi M. 2013. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*. 35(1):386-391.

Camargo A, Woodward J, Call D, Nero L. 2017. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: The Brazilian scenario. *Foodborne Pathogens Disease*. 14 (11): 623-636. doi.org/10.1089/fpd.2016.2274

CDC (Center for disease control and prevention). 2017. Foodborne illness source attribution estimates for 2013 for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Campylobacter* using multi-year outbreak surveillance data, United States. The interagency food safety analytics collaboration. [Consultado 2018 30 de mayo]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/IFSAC-2013FoodborneillnessSourceEstimates-508.pdf>

Chen C, Nace G, Irwin P. 2003. A 6 × 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* 55:475-479. doi: 10.1016/S0167-7012(03)00194-5

Colagiorgi A, Ciccio P, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. 2016. A look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix. *Microorganisms*. 4(3):22. doi.org/10.3390/microorganisms4030022

Colagiorgi A, Bruini I, Ciccio P, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. 2017. *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens* 6(3):41 doi.org/10.3390/pathogens603004.

Corcoran M, Morris D, De Lappe N, O'Connor J, Lalor P, Dockery P, Cormican M. 2014. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and Environmental Microbiology* 80(4):1507-1514. doi.org/10.1128%2FAEM.03109-13

Difco. 2009a. Oxford medium base modifies oxford antimicrobial supplement. In: Difco & BBL. Manual of microbiological culture media. Sparks, MD. Becton, Dickinson and Company. p. 410-412.

Difco. 2009b. XLT4 Agar base XLT4 Agar supplement. In: Difco & BBL. Manual of microbiological culture media. Sparks, MD. Becton, Dickinson and Company. p. 620-621.

Fagerlund A, Møretrø T, Heira E, Briandeb R, Langsrud S. 2017. Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. Applied and Environmental Microbiology 83(17): e01046-17. doi.org/10.1128/AEM.01046-17

FDA (Food and Drug Administration) 2012a. *Listeria monocytogenes*. Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. [Consultado 2018 marzo 02]. Páginas 99-103. Disponible en: www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf

FDA (Food and Drug Administration). 2012b. Salmonella species. Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. [Consultado 2018 marzo 09] Páginas 9-13 Disponible en: www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf

Giaouris E, Nesse L. 2015. Attachment of *Salmonella* spp. to food contact and product surfaces and biofilm formation on them as stress adaptation and survival strategies. In: Hackett C.B. (Ed.), *Salmonella: prevalence, risk factors and treatment options*. Nova science publishers, Inc. p. 111-136. [Consultado 2018, junio 04]. Disponible en: www.researchgate.net/publication/276173311_Attachment_of_Salmonella_spp_to_food_contact_and_product_surfaces_and_biofilm_formation_on_them_as_stress_adaptation_and_survival_strategies

Gilmartin N, Giao M, Keevil C, O’Kennedy R. 2016. Differential internalin A levels in biofilms of *Listeria monocytogenes* grown on different surfaces and nutrient conditions. International Journal of Food Microbiology. 219:50-55. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.004

Hunt S, Werner E, Huang B, Hamilton M, Stewart P. 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. Applied and Environmental Microbiology. 70(12):7418-7425. doi:10.1128/AEM.70.12.7418-7425.2004

Jonson A, Normark S, Rhen M. 2005. Fimbriae, pili, flagella and bacterial virulence. In: Russell W, Herwald H, ed. Concepts in bacterial virulence. Basel: Karger. p. 67-89.

Jun W, Kim MS, Lee K, Millner P, Chao K. 2009. Assessment of bacterial biofilm on stainless steel by hyperspectral fluorescence imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality*. 3:41-48. doi.org/10.1007/s11694-009-9069-1

Kalmokoff ML, Austin JW, Wan XD, Sanders G, Banerjee S, Farber JM. 2008. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 91(4):725-734. doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01419.x

Kim SH, Wei CI. 2009. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*. 72(9):1841-1847.

Mai TL, Conner DE. 2007. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. 120(3): 201-316. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.006

Osorio Rodríguez I. 2014. Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en superficies de cajas de madera y superficies de plástico para el transporte y almacenamiento de tomate pera (*Solanum lycopersicum*). [Tesis] Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 22 p. [Consultado 2018, 24 de mayo] Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/3368/1/AGI-2014-T034.pdf>

Palmer J, Flint S, Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of biofilm. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 34:577-588 doi: 10.1007/s10295-007-0234-4

Phuong Tam M. 2006. Attachment of *Listeria monocytogenes* to austenitic stainless steel. [Tesis] Universidad de Auburn-Alabama. 9 p. [Consultado 2018, 06 de mayo] Disponible en: https://etd.auburn.edu/bitstream/handle/10415/245/MAI_TAM_29.pdf?sequence=1

Runnerswebsite. 2018. 96-well plate template vision cute. [Consultado 2018, junio 13] Disponible en: <http://runnerswebsite.com/96-well-plate-template-icon/96-well-plate-template-vision-cute/>

Sauer K, Richard A, Davies D. 2007. Biofilms and biocomplexity. *Microbe*. 2(7): 347-353 doi:10.1128/microbe.2.347.1

Scallan E, Hoekstra R, Angulo F, Tauxe R, Widdowson M, Roy S, Jones J, Griffin P. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Disease*. 17(1):7-15. doi.org/10.3201/eid1701.091101p1

Smoot LM, Pierson MD. 1998. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *Journal of Food Protection*. 61(10):1293-1298. doi.org/10.4315/0362-028X-61.10.1293

Speranza B, Corbo M, Sinigaglia M. 2011. Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* spp. Biofilm formation. Food Science. 76(1):12-16. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01936.x

Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ggiago J, Gamazo C, Lasa I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. Molecular Microbiology. 43(3): 793-808. doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x

Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology. 38(5):428-432. doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x

Tandoga N, Abadian P, Huo B, Goluch E. 2017. Characterization of bacterial adhesion and biofilm formation. In: Zhang Z, Wagner V ed. Antimicrobial coating and modifications on medical devices. Cambridge. Springer. 67-95. doi.org/10.1007/978-3-319-57494-3_3

Vatanyoopaisarn S, Nazli A, Dodd C, Rees C, Waites W. 1999. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless steel. Applied and Environmental Microbiology. 66(2): 860-863. doi: 10.1128/AEM.66.2.860-863.2000

Zhu Q, Gooneratne R, Hussain M. 2017. *Listeria monocytogenes* in fresh produce: outbreaks, prevalence and contamination levels. Foods. 6(3):21. doi.org/10.3390/foods6030021

7. ANEXOS

Anexo 1. Valores estadísticos después de seis horas de adherencia de *Listeria monocytogenes* en superficies de acero inoxidable.

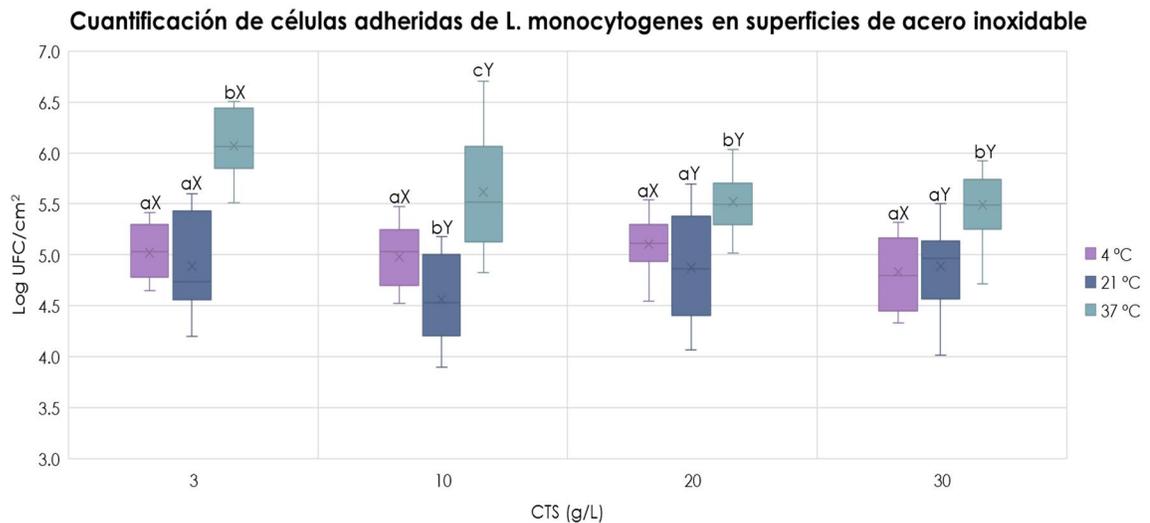
Variables	GL	Valor F	Pr > F
Nutriente	3	3.98	0.0091
Temperatura	2	71.05	<.0001
Nutriente*Temperatura	6	2.70	0.0160
CV(%)	7.18		
R ²	0.52		

GL: Grados de libertad.

CV: Coeficiente de variación

R2: Coeficiente de determinación

Anexo 2. Gráfico de cajas del efecto de concentración de nutriente y temperatura en la adherencia de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable.



Anexo 3. Valores estadísticos después de seis horas de adherencia de *Salmonella* spp. en superficies de acero inoxidable.

Variables	GL	Valor F	Pr > F
Nutriente	2	1.26	0.2892
Temperatura	2	98.86	<.0001
Nutriente*Temperatura	4	3.63	0.0094
CV(%)	7.18		
R ²	0.74		

GL: Grados de libertad.

CV: Coeficiente de variación

R2: Coeficiente de determinación

Anexo 4. Gráfico de cajas del efecto de concentración de nutriente y temperatura en la adherencia de *Salmonella* spp. en superficies de acero inoxidable.

