

**Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en superficies de cajas de madera y superficies cestas de plástico para el transporte y almacenamiento de tomate pera (*Solanum lycopersicum*)**

**Ingrid Carolina Osorio Rodríguez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Honduras**  
Octubre 2014

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en superficies de cajas de madera y superficies cestas de plástico para el transporte y almacenamiento de tomate pera (*Solanum lycopersicum*)**

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

**Ingrid Carolina Osorio Rodriguez**

**Zamorano, Honduras**

Octubre, 2014

**Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en superficies de cajas de madera y superficies cestas de plástico para el transporte y almacenamiento de tomate pera (*Solanum lycopersicum*)**

Presentado por:

Ingrid Carolina Osorio Rodriguez

Aprobado:

---

Mayra Márquez, Ph.D.  
Asesora Principal

---

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

---

Jorge Cardona, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

**Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en superficies de cajas de madera y superficies de cestas de plástico utilizadas para el transporte y almacenamiento de tomate pera (*Solanum lycopersicum*)**

**Íngrid Carolina Osorio Rodríguez**

**Resumen:** Los materiales para el almacenamiento y transporte de productos hortofrutícolas juegan un papel importante en la contaminación de los productos. El objetivo de este estudio fue estimar el factor de adherencia (VA), la formación de biopelículas y la supervivencia de *Salmonella enterica* en cuatro tipos de superficies: madera de *Gmelina arborea* (MG) y madera de *Pinus oocarpa* (MP), "Cesta Agrícola semicalada" (plástico azul, PA) y "Cesta One-way" (plástico negro, PN). Se utilizó la prueba de azul de metileno para evaluar la cantidad de bacterias presentes en la biopelícula y cristal violeta para calcular el VA. En el estudio de supervivencia se evaluó la influencia de dos niveles de materia orgánica (con y sin MO) y la influencia de dos temperaturas (21 °C y 30 °C) durante 16 días de almacenamiento. Se utilizaron medidas repetidas en el tiempo con un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial  $4 \times 2 \times 2$ . Se realizó recuperación de células por la técnica de hisopado (cuantificación) y método de enriquecimiento para la detección (presencia). *S. enterica* se adhirió fuertemente a MP y MG ( $VA > 3$ ), moderadamente en PA ( $VA = 2.99 - 2.00$ ) y débilmente en PN ( $VA = 1.99 - 1.00$ ). *S. enterica* sobrevivió hasta 16 días en las superficies evaluadas. La sobrevivencia fue influenciada por el tipo de superficie y presencia de MO ( $P < 0.05$ ). Se recomienda el uso de cestas plásticas y la implementación de procedimientos de lavado de las cestas en un periodo menor a 4 días para evitar la formación de biopelículas que dificulten la remoción de las bacterias.

**Palabras clave:** Azul de metileno, biopelícula, cristal violeta.

**Summary:** The materials used for the storage and transportation of fruit and vegetables play an important role in product contamination. The aim of this study was to estimate the adhesion factor (VA), biofilm formation and survival of *Salmonella enterica* in four types of surfaces: wood *Gmelina arborea* (MG) and *Pinus oocarpa* (MP), "Cesta agrícola semicalada" (blue plastic, PA) and "Cesta One-way" (black plastic, PN). The methylene blue test was used to assess the amount of bacteria in biofilm and crystal violet to calculate the VA. In the survival study the influence of two levels of organic material (OM) (with or without OM) and the influence of two temperatures (21 °C and 30 °C) were evaluated for 16 days storage. A completely randomized design (DCA) with a factorial arrangement of  $4 \times 2 \times 2$  and repeated measurements over time were used every four days. Recovering cells by swabbing technique (quantification) and enrichment method for detection (presence) was performed. *S. enterica* adhered strongly to MP and MG ( $VA > 3$ ), moderately in PA ( $VA = 2.99 - 2.00$ ) and weakly in PN ( $VA = 1.99 - 1.00$ ). *S. enterica* survived up to 16 days in the areas evaluated. Survival was influenced by the type of surface and the presence of MO ( $P < 0.05$ ). The use of plastic baskets and implementing procedures washing baskets in less than four days period is recommended to prevent the formation of biofilms that impede the removal of bacteria.

**Keywords:** Biofilm, crystal violet, methylene blue.

## CONTENIDO

|  |            |
|--|------------|
| <b>Portadilla</b>                          | <b>i</b>   |
| <b>Página de firmas</b>                    | <b>ii</b>  |
| <b>Resumen</b>                             | <b>iii</b> |
| <b>Contenido</b>                           | <b>iv</b>  |
| <b>Índice de Cuadros, Figuras y Anexos</b> | <b>v</b>   |
| <br>                                       |            |
| <b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>                 | <b>1</b>   |
| <b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>         | <b>3</b>   |
| <b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>       | <b>11</b>  |
| <b>4 CONCLUSIONES.....</b>                 | <b>24</b>  |
| <b>5 RECOMENDACIONES.....</b>              | <b>25</b>  |
| <b>6 LITERATURA CITADA.....</b>            | <b>26</b>  |
| <b>7 ANEXOS.....</b>                       | <b>29</b>  |

## INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadro |  | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Descripción de los tratamientos a evaluar para formación de biopelícula.....   | 6      |
| 2      | Descripción de los tratamientos para evaluar la sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> en diferentes superficies durante un periodo de 16 días.....   | 9      |
| 3      | Clasificación semi-cuantitativa de la adherencia de <i>Salmonella enterica</i> en cuatro superficies.....  | 12     |
| 4      | Valores promedio de absorbancia ( $A_{490\text{nm}}$ ) para azul de metileno reducido y absorbancia ( $A_{540\text{nm}}$ ) de cristal violeta retenido en dos tipos de materiales para almacenar/transportar tomate .....                  | 14     |
| 5      | Valores promedio de absorbancia ( $A_{490\text{nm}}$ ) para azul de metileno reducido y absorbancia ( $A_{540\text{nm}}$ ) de cristal violeta retenido en 4 superficies de dos tipos de materiales para almacenar/transportar tomate ..... | 14     |
| 6      | Cuadro 1: Concentraciones iniciales promedio de <i>Salmonella</i> spp. (Log UFC/superficie) sobre diferentes tipos de material para evaluar su sobrevivencia.....  | 15     |
| 7      | Influencia de la presencia/ ausencia de materia orgánica en la sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> en una periodo de 16 días. Expresado como Log UFC / superficie .....  | 17     |
| 8      | Influencia del tipo de material en la sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> en una periodo de 16 días expresados como logaritmos de UFC / superficie.  | 17     |
| 9      | Influencia del ambiente en la sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> en una periodo de 16 días .....  | 23     |
| 10     | Nivel de significancia en la interacción de factores para cada tipo de superficie .....  | 23     |

| Figura   | Página |
|--|--------|
| 1 Tipo de material en orden de aparición de izquierda a derecha: madera gmelina, madera pino, plástico azul, plástico negro.....   | 4      |
| 2 Valores de absorbancia de cristal violeta a 540 nm en cuatro superficies de cajas para almacenar/ transportar tomates, inoculada con una mezcla de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Salmonella</i> Poona .....   | 11     |
| 3 Valores de absorbancia de azul de metileno a 490 nm en cuatro superficies de cajas para almacenar/ transportar tomate inoculadas con una mezcla de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Salmonella</i> Poona.....  | 13     |
| 4 Comportamiento promedio de <i>Salmonella enterica</i> en madera y plástico durante un periodo de 16 días.....  | 18     |
| 5 Comportamientos de <i>Salmonella enterica</i> en cuatro superficies en un periodo de 16 días.....  | 18     |
| 6 Comportamiento de <i>Salmonella enterica</i> en tratamientos utilizando dos superficies de tipo madera. Líneas continuas (gmelina) (MG) y líneas punteada (pino) (MP) en presencia de materia orgánica (símbolos rellenos) (C) y sin materia orgánica (símbolos abiertos) (N) a 30 °C (cuadros) (H) y a 21 °C (círculos) (S).....                    | 20     |
| 7 Comportamiento de <i>Salmonella enterica</i> en tratamientos utilizando dos superficies de tipo plásticos. Líneas continuas (plástico negro) (PN) y líneas punteada (plástico azul) (PA) en presencia de materia orgánica (símbolos rellenos) (C) y sin materia orgánica (símbolos abiertos) (N) a 30 °C (triángulos) (H) y a 21 °C (rombo) (S)..... | 21     |

| Anexo  | Página |
|--|--------|
| 1 Reducción y adherencia de <i>Salmonella enterica</i> en cuatro superficies .....   | 29     |
| 2 Sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> en dos tipos de materiales utilizados para el transporte y almacenamiento.....   | 29     |
| 3 Influencia de cuatro diferentes superficies en la sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> en una periodo de 16 días. Expresados como logaritmos de UFC /superficie.....  | 30     |
| 4 Comportamiento promedio de <i>Salmonella enterica</i> en el día 0 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H).....    | 31     |
| 5 Comportamiento promedio de <i>Salmonella enterica</i> en el día 4 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) y dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H).....  | 32     |
| 6 Comportamiento promedio de <i>Salmonella enterica</i> en el día 8 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) y dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H).....  | 33     |
| 7 Comportamiento promedio de <i>Salmonella enterica</i> en el día 12 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) y dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H)..... | 34     |
| 8 Comportamiento promedio de <i>Salmonella enterica</i> en el día 16 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) y dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H)..... | 35     |

## INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años se ha observado un aumento en el consumo de alimentos mínimamente procesados. Los consumidores buscan productos frescos, convenientes y cada vez más con menor uso de preservantes (Sant'Ana *et al.* 2011). Con esta tendencia surge también el aumento en las enfermedades transmitidas por alimentos (Olaimat y Holley 2012). Brotes de *Salmonella spp.* han sido relacionados con el consumo de tomates frescos (Trinetta *et al.* 2010), causando así un gran impacto económico y social en este mercado. Es por esta razón que la industria se ve en la necesidad de implementar métodos que disminuyan el riesgo de contaminación microbiana y a la misma vez promuevan una mayor vida anaquel y conserve mejor las características del fruto fresco (Kroupitski *et al.* 2011).

La salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia a nivel mundial (Stepanovic *et al.* 2002). Se estima que en Estados Unidos 42,000 casos de salmonelosis son reportados anualmente, de los cuales 23,000 resultan es hospitalizaciones y entre 400-600 son casos de muerte. En Brasil, *Salmonellae* son de los mayores causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, responsables aproximadamente de un 47% de estas (Sant'Ana *et al.* 2011).

Se ha determinado que varios factores pueden afectar en la contaminación bacteriana de los productos hortofrutícolas, incluyendo a los múltiples materiales comúnmente utilizados en el transporte de alimentos como por ejemplo aluminio, plástico, madera y acero inoxidable. Se ha demostrado con *Escherichia coli* K12 y *Salmonella* Typhimurium P6 que la presencia de residuos orgánicos en las cajas utilizadas para transportar alimentos se convierte en focos donde interactúan las bacterias, haciendo mucho más difícil la eliminación de bacterias (Abban *et al.* 2012).

La capacidad de formar biopelículas de *Salmonella spp.* es de gran preocupación para la industria ya que se ha comprobado su capacidad de formarlas en muchos materiales como ser vidrio, acero inoxidable (Giaouris y Nychas 2006), hule (Sinde y Carballo 2000) y diferentes tipos de plásticos (Soares *et al.* 2012). Las biopelículas son depósitos de células con afinidad a las superficies, contenidas en una matriz polimérica con canales para el flujo de agua y otros fluidos (Donlan y Costerton 2002). La adherencia se caracteriza por un proceso que inicia con la fijación de las bacterias a la superficie, la formación de microcolonias, producción de sustancias poliméricas extracelulares (ECP por sus siglas en ingles), y finalmente la maduración (Davey y O'Toole 2000). Para que se lleve a cabo la formación de la misma debe de proporcionarse el ambiente adecuado como ser alta densidad celular, temperatura, presencia de  $O_2$ ,  $CO_2$ , pH y compuestos nitrogenados (Guiney 1997).

La elección de material de los recipientes donde se almacenan o se transportan los alimentos es de suma importancia ya que sus características físicas y químicas los hacen más o menos propensos a acumular agentes microbianos. Así como la interacción de diferentes factores ambientales, bióticos y abióticos (Abban *et al.* 2012) y su influencia en la sobrevivencia de *Salmonella spp.* De especial importancia es la presencia de materia orgánica en la superficie, donde se ha visto que la presencia de materia orgánica hace que las bacterias se adhieran rápidamente (Abban *et al.* 2012),

El proceso de formación de biopelículas en la industria de alimentos es de suma importancia. Ya que se estima que un 65 - 80% de las infecciones en humanos son causadas por la interacción con biopelículas y no con células aisladas (Coenye y Nelis 2010). La capacidad de formar biopelículas en *Salmonellae* está regulado por las condiciones del ambiente (Stepanovic *et al.* 2002), ya que son estos factores los que se encargan de activar las fimbrias delgadas de agregación (agfD por sus siglas en inglés) (Römling *et al.* 2000). Las fimbrias son extensiones filamentosas parecidas a los flagelos responsables de las interacciones célula- célula y célula-superficie (Bridier *et al.* 2014).

Nuevos métodos se han descrito como alternativa para la cuantificación de biopelículas en platos de microtitulación y se los puede dividir como ensayos de estimación de la matriz, biomasa total y viabilidad. Una amplia gama de métodos actuales utilizan el principio de tinción para la cuantificación de la biomasa del biopelícula. La diferencia entre tinciones radica en el principio de difusión o actividad enzimática en la que intervienen. Entre los métodos más utilizados se encuentra Cristal Violeta (CV) (Christensen *et al.* 1985), Syto 9 (Bouloset *et al.* 1999), 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonilo]- 2H-tetrazolium hidróxido (XTT) (Gabrielson *et al.* 2002), resazurina (O'Brien *et al.* 2000), fluoresceína diacetate (FDA.) (Adam y Duncan 2001), 1,9- dimethyl methylene blue (DMMB) (Enobakhare *et al.* 1996).

Con este estudio se espera determinar cuáles son los factores que afectan la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en cajas de madera y cestas de plástico que son utilizadas para almacenar y transportar tomates. Con el fin de poder hacer una mejor toma de decisiones al momento de elegir el material de las cajas y el manejo de las mismas, ya que hay estudios que demuestran que la temperatura del ambiente y el tiempo que las bacterias permanecen en la superficie son factores determinantes en la formación de biopelículas (Stepanovic *et al.* 2002). A la misma vez observar el comportamiento de esta bacteria a lo largo de un periodo definido (16 días).

Los objetivos del estudio son:

- Evaluar la formación de biopelícula de *Salmonella enterica* y su adherencia en plástico y madera utilizando espectrofotometría como método indirecto.
- Evaluar la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en dos diferentes superficies de maderas y dos superficies de plástico utilizados para almacenamiento / transporte de tomates.
- Determinar cuáles son los factores que afectan la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en cajas de madera y cestas de plástico utilizadas para almacenar/ transportar tomates.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LMAZ), dirigido por la Dra. Mayra Márquez González. El mismo se encuentra ubicado en el Departamento de Agroindustria Alimentaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, localizada en el km 30 carretera hacia Danlí, en el departamento de Francisco Morazán, Honduras.

Cultivos bacterianos:

- *Salmonella enterica subespecie enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium ( ATCC<sup>®</sup> 14028). Designación de la cepa: CDC 6516-60. (American Type Culture Collection)
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Poona (ATCC<sup>®</sup> BAA-1673D-5<sup>™</sup>). Designación de la cepa: MZ1481. (American Type Culture Collection)

Se conservaron en tubos de ensayo inclinados (150×16 ml) con agar soya Trypticasa a 4 °C ± 2 °C. La reactivación de las cepas se realizó tomando una colonia del cultivo de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Salmonella enterica* serovar Poona preservadas en refrigeración a 4 °C ± 2 °C y se transfirieron, de manera aséptica y separadas, a tubos de ensayo con 10 ml de caldo Soya Trypticasa con extracto de levadura (CSTEL), estos fueron incubados a 35 °C durante 24 horas. Luego se tomó 1 gota biconvexa del caldo y se sembraron por medio de estriado en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) en un plato Petri, estos cultivos se llevaron nuevamente a incubación durante 24 horas a 35 °C. Posteriormente se tomó, con la ayuda de un asa, una colonia y se llevaron a dilución en 10 ml de CSTEL. Éste fue nuevamente incubado a 35 °C durante 24 horas. Se estuvo evaluando el crecimiento de las cepas para asegurarse de llegar a la concentración deseada que fue 10<sup>8</sup> UFC/ml. La suspensión de células fue lavada para descartar metabolitos y células muertas presentes en el medio de cultivo. En el cual se transfirieron los 10 ml de caldo inoculado en el tubo de ensayo (150×16 ml) a un tubo Falcon<sup>®</sup> especial para utilizar en centrifugas. Se llevó al caldo con *Salmonella enterica* a centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos a 21 °C, para posteriormente descartar el sobrenadante y conservar las células de *Salmonella enterica*. Luego se añadieron 5 ml de buffer a cada tubo Falcon<sup>®</sup> y fue centrifugado nuevamente. Este procedimiento se repitió dos veces más. Y este fue el medio utilizado para inocular. Los recuentos del inóculo fueron verificados mediante la siembra de diluciones decimales sobre agar XLD por la técnica de siembra por superficie e incubados a 35 °C por 24 horas.

**Descripción de los materiales.** Las superficies utilizadas fueron dos tipos de madera y dos tipos de plástico:

- Gmelina (*Gmelina arborea*): las piezas utilizadas median  $2 \times 4 \times 0.4$  cm. Este era una madera de color clara. Estas fueron cortadas con una sierra eléctrica redonda en la unidad de manejo Forestal y aserradero de Zamorano.
- Pino (*Pinus oocarpa*): las piezas median  $3 \times 3 \times 0.4$  cm para la evaluación de la sobrevivencia de *S. enterica*. Para la evaluación de biopelícula las dimensiones fueron  $1.5 \times 3 \times 0.4$  cm Esta madera tenía una superficie más rugosa que la gmelina. Estas fueron cortadas con un sierra eléctrica redonda en la unidad de manejo Forestal y aserradero de Zamorano.
- Plástico azul: polietileno de alta densidad. Las dimensiones eran  $3 \times 3 \times 0.3$  cm. Canasta agrícola semi calada Megaplast®. Comprada a la planta hortofrutícola Zamorano. La condición utilizada para el experimento fue nueva. Estas fueron cortadas con un sierra eléctrica redonda en la unidad de manejo Forestal y aserradero de Zamorano.
- Plástico negro: polietileno de alta densidad. Dimensiones  $4 \times 4 \times 0.05$  cm. La condición de este material era usado. Estas piezas fueron cortadas con la ayuda de una tijera.

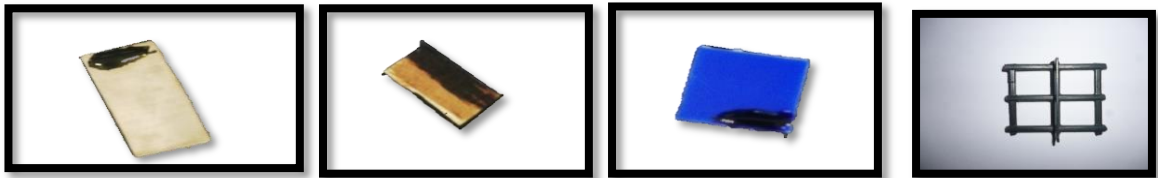


Figura 1: Tipo de material en orden de aparición de izquierda a derecha: madera gmelina, madera pino, plástico azul, plástico negro.

Las superficies previas a ser utilizadas fueron lavadas utilizando cinco gramos de detergente XEDEX por cada medio litro de agua. Luego estas fueron lavadas con cepillos de cerdas suaves para remover cualquier tipo de impureza. Luego se enjuagaron 6 veces cada superficie hasta retirar el detergente. Luego se dejaron secar al ambiente ( $21 \pm 2$  °C) durante  $24 \pm 4$  horas. Después fueron esterilizadas a  $121$  °C durante 20 minutos. Evaluación de la formación de biopelícula. Para inducir la formación de biopelículas se proporcionó a la bacteria un medio rico en nutrientes el cual estará compuesto en una relación 1:1 de caldo soya tripticasa con extracto de levadura (CSTEL) inoculado con *Salmonella* Poona y *Salmonella* Typhimurium en una concentración de  $10^7$  UFC/ml y buffer de fosfatos respectivamente. Se inocularon  $10 \mu\text{l}$ , del medio descrito anteriormente, en un área de  $2 \times 0.3$  cm de cada una de los tipos de materiales.

**Método de reducción.** Se midió la población de bacterias presentes en el plástico y la madera a las 24 horas de haber sido inoculadas. Tomando como referencia el método utilizado por Xiaogang Li *et al.* (2003) con pequeñas modificaciones. Una vez madurada la biopelícula se lavó con  $150 \mu\text{l}$  de solución de buffer de fosfatos para eliminar las

células que no formaron biopelículas y el exceso de caldo. Se dejaron secar las piezas durante 20 minutos para luego agregar 130 µl de una solución cloruro de metiltionina comercialmente conocido como azul de metileno. Se dejaron incubar las piezas durante 3.5 horas a 35 °C en un ambiente oscuro. Luego fueron lavadas con 4 ml de alcohol al 95%. La solución resultante del lavado fue llevado al espectrofotómetro Portlab® 511 UV/Vis Spectrophotometer y en él se midió el nivel de absorbancia de la misma a 490 nm. De esta manera se podrá relacionar el nivel de absorbancia con la presencia de bacterias en la superficie. La cadena respiratoria de las bacterias está localizada en la membrana plasmática. En esta se ubica la enzima encargada de la respiración la cual es el aceptor natural de hidrógenos, o electrones de manera general. En el ciclo normal de la respiración de las bacterias el oxígeno actúa como el aceptor de hidrógenos final y esto permite que el oxígeno molecular sea reducido a agua o peróxido de hidrogeno. Pero existen otros aceptores de electrones artificiales como ser el azul de metileno que tiene la capacidad de ubicarse en la cadena respiratoria y desviar el curso de estos hidrógenos uniéndolos a su estructura, en lugar del oxígeno, logrando así la reducción del azul de metileno (MacFaddin 2003). Considerando que entre más claro el color mayor cantidad de bacterias ya que han reducido el oxígeno disponible Como línea basal se utilizaron placas del mismos material (plástico o madera) lavados con etanol al 95% y como control se realizó el mismo procedimiento un una superficie estéril, agregando el caldo estéril sin haberlo inoculado para corregir el error de absorción de colorante y del medio de cultivo de cada material.

**Adherencia de biopelículas a superficies.** Se evaluó la adherencia de las biopelículas a las 24 horas de haber sido inoculadas. Tomando como referencia el método utilizado por Naves *et al* 2008 con pequeñas modificaciones, utilizando espectrofotometría como método indirecto para evaluar la adherencia a las superficies. Brevemente, se inocularon 10 µl de la suspensión de bacterias en un área de 2 × 0.3 cm de cada una de las piezas de materias primas y fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas, para lograr la maduración de la biopelícula. Pasado este tiempo se lavó la superficie con 150 µl de solución de buffer de fosfatos para eliminar las células que no formaron biopelículas y el exceso de caldo. Se dejaron secar las piezas durante 20 minutos. Luego se agregaron 130 µl de solución de Cristal violeta (1%). Después de cinco minutos de reposo del colorante, cada superficie fue lavada cuatro veces con 180 µl de agua destilada. Se dejaron secando durante 45 minutos y luego se lavaron las piezas con 4 ml de etanol al 95% para remover el colorante absorbido por las células que formaron la biopelícula.

La solución resultante del lavado con alcohol fue transferida a las celdas de poliestireno de base cuadrada. Estas presentan dos caras opuestas transparentes de manera que sólo permiten el paso del rayo de luz a través de ese par de caras. Las otras dos caras opacas presentan rugosidad para facilitar el manejo. Para evaluar la absorbancia por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. Tomando en cuenta que entre mayor presencia de cristal violeta mayor fue la cantidad de bacterias adheridas a la superficie. Como línea basal se utilizaron celdas con etanol al 95% y como control se realizó el mismo procedimiento un una superficie estéril, agregando el caldo estéril sin haberlo inoculado para corregir el error de absorción de colorante de cada material.

Para cuantificar los datos obtenidos por el espectrofotómetro en el estudio de adherencia de biopelículas se calcularon los datos tomando en cuenta el valor de Absorbancia para determinarlos como el factor de formación de biopelículas o valor de adherencia específicamente (VA) de acuerdo con la ecuación 1 (Naves *et al.* 2008):

$$VA = VS - VC \quad [1]$$

Donde

- VA: factor de formación de biopelículas
- VS: valor de absorbancia de cada superficie
- VC: valor de la absorbancia obtenido del control

Una vez calculado el factor VA, se clasificaron los valores como Adherencia Fuerte (VA > 0.30), Moderada (VA de 0.20 - 0.29), débil (VA de 0.10 - 0.19), y negativa (VA < 0.10) (Naves 2008).

**Diseño experimental y análisis estadístico.** El diseño del experimento fue un diseño completamente al azar (DCA). Cada tratamiento corresponde a una superficie (Cuadro 1) (Pino, Gmelina, plástico azul o plástico negro). Para incrementar los grados de libertad y aumentar el poder del análisis estadístico se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo. La combinación de los 4 tratamientos por 3 repeticiones resulta en un total de 12 unidades experimentales. Se utilizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) para determinar si hay diferencia significativa entre tratamientos. De detectarse diferencia significativa entre tratamientos, se utilizó una separación de medias de Tukey para determinar los tratamientos significativos. El grado de significancia del experimento fue de 95% (P < 0.05). El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software "Statistical Analysis System" (SAS 9.4).

Cuadro 2: Descripción de los tratamientos a evaluar para formación de biopelícula

| Superficie | Madera Gmelina (MG) | Madera Pino (MP) | Plástico Azul (PA) | Plástico Negro (PN) |
|------------|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|
|------------|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|

**Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella enterica*.** Se hizo referencia al método utilizado por Abban *et al.* (2012) y Wang y Rayser (2013) con pequeñas modificaciones. Se utilizaron cuadrados de dos variedades de madera Gmelina (*Gmelina arborea*) y Pino (*Pinus oocarpa*), con las dimensiones descritas en la metodología. También se evaluaron dos diferentes tipos de polipropileno de alta densidad. Éstas fueron lavadas con agua destilada, jabón suave y papel cepillo de cerdas suaves, para evitar dañar la superficie, y secado al ambiente durante 24 horas, seguido por esterilización en autoclave Sterimatic® durante 20 minutos a 120 °C. Luego de este tiempo los cuadros de materias primas se almacenaron hasta ser inoculados para el desarrollo del experimento.

Las superficies que fueron expuestas a presencia de materia orgánica (pulpa y exudados de tomate) fueron inoculadas con una solución que constó de 22.5 ml de buffer de fosfato, 22.5 gramos de tomate pera (*Solanum lycopersicum*) 2.5 ml de *Salmonella* Poona y 2.5 ml

de *Salmonella* Typhimurium. Los tomates utilizados fueron lavados y desinfectados con una solución desinfectante de cloro Magia Blanca (200 ppm) durante 10 minutos. Se cortaron en cubos con la ayuda de un bisturí estéril y fueron transferidos asépticamente a bolsas de plástico esterilizadas donde fueron triturados, mezclados con el buffer de fosfatos y homogenizados con la ayuda del Stomacher. Se midió el pH y de ser necesario se ajustó a  $6.80 \pm 0.20$ .

Para los tratamientos con ausencia de materia orgánica se utilizaron 45 ml de buffer de fosfatos, 2.5 ml de la suspensión de células de *Salmonella* Poona y 2.5 ml de *Salmonella* Typhimurium. Se colocaron cuatro piezas de madera o plástico por inóculo y se homogenizaron en el agitador orbital a velocidad 2 durante 5 minutos.

Posterior a la inoculación de las superficies fueron colocadas en platos Petri de vidrio Pyrex® previamente esterilizados y se mantuvieron expuestos al ambiente hasta que los mismos se secaran, para evitar posterior enmohecimiento durante el almacenamiento y fueron expuestos a los respectivos tratamientos de humedad y temperatura (Cuadro 2).

**Muestreo y análisis microbiológico de las superficies.** Se utilizó en las cuatro superficies el método de hisopado para cuantificar la sobrevivencia de *Salmonella enterica*. Se tomó un hisopo estéril el cual se frotó sobre la superficie previamente inoculada, hasta asegurarse que se había cubierto el área de la materia a evaluar completamente durante 1 minuto y se colocó en un tubo de ensayo con 10 ml de buffer de fosfato. De este se tomó 1 ml de cada tratamiento y se distribuyó en 1 placa Petri con Agar Soya Tripticasa (15 ml por placa Petri). Luego se esparció sobre la superficie de la placa Petri hasta que esta quedara aparentemente seca. Se vació sobre ella 5 ml de agar XLD como medio selectivo. Se incubaron por  $24 \pm 2$  horas a  $35^\circ\text{C}$ .

Para determinar el límite cuantificable por medio del método de hisopado los datos fueron utilizadas las dimensiones de cada material, descritas en el enunciado de materiales) la ecuación 2.

$$\text{LOG} \left[ (\text{UFC} \times \text{DILUCIÓN}) \times \frac{10 \text{ ml}}{\text{superficie}} \right] = \text{LogUFC}/\text{superficie} \quad [2]$$

Tomando en cuenta que lo mínimo que se puede cuantificar es -0.69 UFC/ superficie, este se estableció como el límite cuantificable. En caso de reportar ausencia de *UFC/ superficie*, es decir que no se logró cuantificar, se utilizó el método de inmersión en caldo de enriquecimiento con el cual se determinará ausencia/presencia de *Salmonella enterica*. Para la inmersión se midieron 25 ml de caldo Soya Tripticasa y se vaciaron en una bolsa plástica estéril. Para la recuperación de las bacterias que sobrevivieron en la superficie pero que se encontraron bajo el límite cuantificable en la superficie. Asépticamente se tomó la materia prima y se introdujo en la bolsa con los 25 ml de caldo Soya tripticasa. Luego todas las muestras fueron homogenizadas en Agitador orbital durante 5 minutos a velocidad 2. Esto fue incubado a  $35^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Pasado este periodo de cada bolsa con el tipo de superficie adentro se tomó una gota biconvexa y fue sembrada por estriado en agar Xilosa lisina decocicolato (XLD), e incubada por  $24 \pm 2$

horas a 35 °C. El límite de detección de la presencia/ausencia de *Salmonella enterica* se calculó utilizando la ecuación 3.

$$\text{LOG} \frac{[(UFC \times DILUCIÓN) \times \frac{10 \text{ ml}}{\text{superficie}}]}{2} = \text{Log UFC / superficie} \quad [3]$$

Cuadro 3: Descripción de los tratamientos para evaluar la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en diferentes superficies durante un periodo de 16 días.

| <b>Materia orgánica</b> | <b>Ambiente</b>  | <b>Tipo de superficie</b>  |                         |                           |                            |
|-------------------------|------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                         |                  | <b>Madera Gmelina (MG)</b> | <b>Madera Pino (MP)</b> | <b>Plástico Azul (PA)</b> | <b>Plástico negro (PN)</b> |
| Ausencia (N)            | 22 °C/HR 16% (S) | MGNS                       | MPNS                    | PANS                      | PNNS                       |
| Presencia (C)           | 22 °C/HR 16% (S) | MGCS                       | MPCS                    | PACS                      | PNCS                       |
| Ausencia (N)            | 30 °C/HR 16% (H) | MGNH                       | MPNH                    | PANH                      | PNNH                       |
| Presencia (C)           | 30 °C/HR 16% (H) | MGCH                       | MPCH                    | PACH                      | PNCH                       |

**Diseño experimental y análisis estadístico.** Para evaluar la sobrevivencia de *S. enterica* el diseño del experimento fue un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de tres factores, resultando en  $4 \times 2 \times 2$ . El factor A correspondió a superficie (Pino, Melina, plástico negro plástico azul), el factor B correspondió al ambiente (21 °C/28% humedad relativa o 30 °C/16% humedad relativa) y el factor C correspondió a materia orgánica (con materia orgánica o sin materia orgánica) dando un total de 16 tratamientos. Al finalizar el experimento se evaluó el efecto de los factores independientemente y su interacción (A, B, C, A\*B, A\*C, B\*C, A\*B\*C). Fue de especial interés la dinámica del crecimiento de *Salmonella* a través del periodo de incubación por lo que el diseño experimental incluyó medidas repetidas en el tiempo. De cada unidad experimental se tomó una muestra de la población de *Salmonella* cada cuatro días durante un periodo de 16 días dando un total de cinco muestreos. Para incrementar los grados de libertad y aumentar el poder del análisis estadístico se realizaron tres repeticiones de cada ensayo. La combinación resultó en 48 unidades experimentales evaluadas cinco veces cada cuatro días.

Se utilizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) para determinar si hubo diferencia significativa entre tratamientos. De detectarse diferencia significativa entre tratamientos, se utilizó una separación de medias de Tukey para determinar los tratamientos significativos. Se utilizó LS MEANS para identificar si hay efecto de la interacción de los factores. El grado de significancia del experimento fue de 95% ( $P < 0.05$ ). El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software "Statistical Analysis System" (SAS 9.4).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Evaluación de la formación de biopelícula.** Comparando los dos tipos de materiales evaluados, según el análisis estadístico, se obtuvo que, en cuanto a absorbancia, la madera tiene mayor capacidad de retener bacterias en comparación al plástico ( $P < 0.05$ ) (Figura 2). Estos resultados concuerdan con los reportados por Moore en el 2007, quien explica que la alta porosidad de ciertos materiales, como ser la madera, permite que las bacterias se adhieran de una manera más fuerte en comparación a aquellos que son de menor porosidad por ejemplo el vidrio.

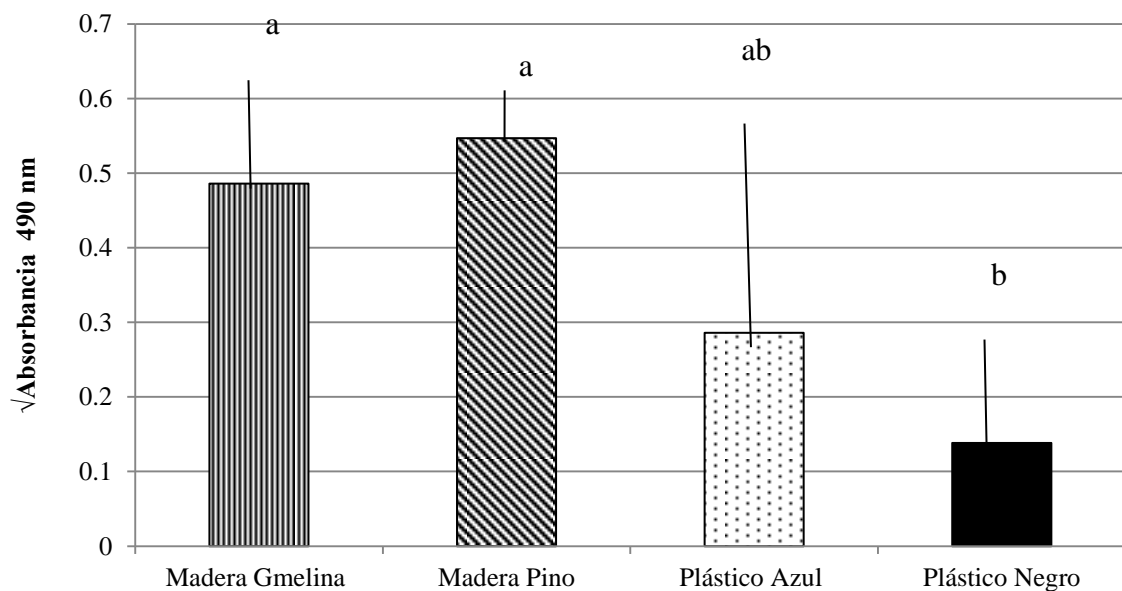


Figura 2: Valores de absorbancia de cristal violeta a 540 nm en cuatro superficies de cajas para almacenar/ transportar tomates, inoculada con una mezcla de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Poona.

Aunque no se observaron diferencias significativas en la absorbancia del colorante cristal violeta retenido entre todos los diferentes tipos de superficies por métodos estadísticos, al utilizar como variable de respuesta el factor de adherencia propuesto por Naves *et al.* (2008), se obtuvieron valores semi-cuantitativos que permiten clasificar la adherencia como fuerte, moderada, débil o negativa (Cuadro 3). Se obtuvieron los siguientes resultados: *Salmonella enterica* se adhirió fuertemente (valores  $> 0.30$ ) a la madera de pino y a la madera de Gmelina con valores de 0.68 y 0.48, respectivamente. En el plástico azul se considera que tiene una adherencia moderada ya que su valor 0.26 se

encuentra dentro del rango de 0.22 – 0.29. Con respecto al plástico negro es débil ya que su valor es menor a 0.19. Esta información es crucial para ser considerada al momento de limpiar y desinfectar las cajas para transportar/ almacenar tomates. Ya que son estas clasificaciones las que nos permiten visualizar cuales son aquellas materias en las que se necesitan métodos más abrasivos para disminuir la carga microbiana.

Cuadro 4: Clasificación semi-cuantitativa de la adherencia de *Salmonella enterica* en cuatro superficies.

| <b>Superficie</b> | <b>Factor de formación de biopelícula<sup>‡</sup></b> | <b>Clasificación<sup>‡</sup></b> |
|-------------------|---|----------------------------------|
| Madera Pino       | 0.54  | Fuerte                           |
| Madera Gmelina    | 0.48  | Fuerte                           |
| Plástico Azul     | 0.28  | Moderada                         |
| Plástico negro    | 0.13  | Débil                            |

<sup>‡</sup>Factor de formación de biopelículas = valor de absorbancia de cada superficie - valor de la absorbancia obtenido del control

<sup>‡</sup> Clasificación realizada por Naves *et al.* (2008): Fuerte >0.30, Moderada 0.20 - 0.29, débil 0.10 – 0.19, negativa < 0.10

La adherencia de las bacterias a las superficies corresponde a la interacción de muchos factores ya que existen factores inherentes a la naturaleza de las superficies como ser la higroscopicidad, porosidad, dirección de las fibras en el caso de las maderas (Milling *et al.* 2005) o la rugosidad de los plásticos u otras superficies (USDA-FSIS 2013). De los factores que mayor efecto tienen en la formación de la misma son los de carácter ambiental, por ejemplo la interacción de la fase aire-liquido es crucial ya es en esta interface donde se ha cuantificado la mayor cantidad de biopelícula (Römling y Gerstel 2001). Es decir esto se podría encontrar en aquellas superficies que permanecen húmedas, es por esto de especial interés las condiciones en las que se almacenan o se mantienen estos materiales, para evitar proporcionar las condiciones ideales.

Aunque las características físicas de la madera *per se* podrían prestarse para asumir que tendrán mayor cantidad de adherencia de bacterias todo el tiempo, esto no es del todo cierto. Un estudio realizado en tablas para cortar mostró que una pieza de madera nueva se comporta de una manera similar a una pieza de madera que ya está usada y con más daños en la superficie. Esto referente a la cantidad de bacterias que retiene y a su facilidad para limpiar. Mientras que por el contrario el plástico nuevo difiere mucho en su comportamiento a uno que ya tiene la superficie lacerada, en el caso del estudio, rayas hechas por el uso de cuchillos. Este se volvía cada vez más difícil de limpiar con los métodos convencionales. Utilizando un microscopio electrónico se observó que después de uso existía mayor cantidad de residuos de alimentos en estos plásticos que en madera (Cliver 2006).

Cuantificación del número de bacterias en la biopelícula por el método de reducción de azul de metileno. Hubo mayor concentración de bacterias ( $P < 0.05$ ) en madera en comparación al plástico evaluado en este estudio (Cuadro 4). Este resultado se obtiene de los valores absorbancia del azul de metileno reducido, el cual tiene una relación indirectamente proporcional a la saturación del color del azul del metileno, con relación al tiempo y a la cantidad de bacterias presentes. A mayor cantidad de bacterias presente en el tipo de material inoculado mayor será la reacción de reducción del azul de metileno haciendo que este tenga una saturación cada vez menor en función del tiempo.

El plástico azul, el plástico negro y la gmelina fueron superficies en las que se retuvo igual cantidad de bacterias (Figura 3). La rugosidad y absorción de líquidos de la superficie es una de los factores que pudieron haber influenciado para que gmelina se comporte de manera similar al plástico. Fue algo interesante que al momento de hacer esta prueba, al contrario de pino, la gmelina no absorbía el líquido sino que lo retenía sobre la superficie de la misma manera que lo hacían los plásticos. Existen estudios que muestran como la rugosidad de la superficie si afecta a la retención de *Salmonella* spp. Por ejemplo en la superficie de melones cantaloupe (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) se ha observado una mayor cantidad de bacterias que en hoyendew (*Cucumis melo* var. *inodorus*) debido a la diferencia en rugosidad de los mismos siendo de mayor rugosidad el melón cantaloupe (Ukuku y Sapers 2007).

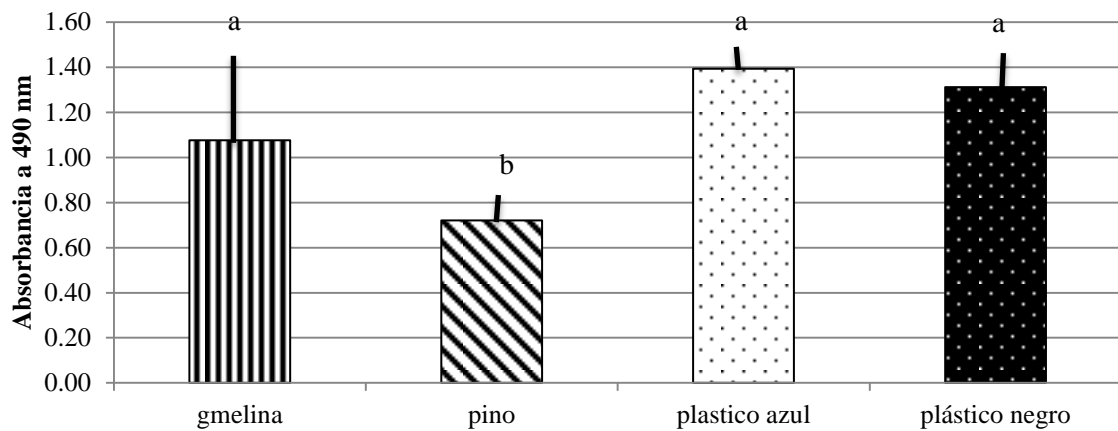


Figura 3: Valores de absorbancia de azul de metileno a 490 nm en cuatro superficies de cajas para almacenar/ transportar tomate inoculadas con una mezcla de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Poona.

\* Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Generalmente se podría afirmar que el comportamiento de los microorganismos tendería a disminuir con el paso del tiempo, mientras no exista un suministro constante o renovación de nutrientes sobre la superficie. El crecimiento logarítmico de la densidad de bacterias corresponde mayormente a la disponibilidad de nutrientes (Sutherland 2001). Ya que si la cantidad de sustrato disponible para el crecimiento de microorganismos se va agotando, eventualmente estos llegarán a morir por falta del mismo o por el exceso de metabolitos

tóxicos presentes en el medio. Si por el contrario existe un suministro constante de nutrientes se ha observado como esta población aumenta en comparación aquella en la que los nutrientes nunca fueron renovados (Giaouris y Nychas 2006).

Los dos estudios de evaluación de biopelícula tienen bastante relación entre ellos ya que, aquellas que mostraron mayor adherencia a la superficie (retención de cristal violeta) (Figura 2) también fueron las superficies que mostraron alta cuantificación de biopelícula (mayor reducción de azul de metileno) (Figura 3). En este estudio el de mayor adherencia y mayor reducción fue la madera de pino y el de menor reducción y menor cantidad de bacterias adheridas a la superficie fue el plástico negro (Cuadro 4).

**Cuadro 5:** Valores promedio de absorbancia ( $A_{490nm}$ ) para azul de metileno reducido y absorbancia ( $A_{540nm}$ ) de cristal violeta retenido en dos tipos de materiales para almacenar/transportar tomate <sup>‡</sup>.

| Tipo de material                     | Prueba de reducción de azul de metileno | Prueba de Adherencia         |
|--------------------------------------|---|------------------------------|
|                                      | Media $\pm$ DE                          | Media $\pm$ DE               |
| Madera                               | 0.97 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>            | 0.51 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup> |
| Plástico                             | 1.41 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>            | 0.21 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup> |
| <b>Coefficiente de Variación (%)</b> | <b>12.72</b>                            | <b>45.20</b>                 |

<sup>‡</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).  
DE: Desviación estándar.

Evaluando individualmente cada superficie se puede observar que no existen diferencias significativas entre la adherencia de *Salmonella enterica* a Gmelina (MG), Pino (MP), y Plástico Azul (PA), pero que esta misma adherencia si es diferente para el Plástico Negro (PN) como muestra el Cuadro 5.

**Cuadro 6:** Valores promedio de absorbancia ( $A_{490nm}$ ) para azul de metileno reducido y absorbancia ( $A_{540nm}$ ) de cristal violeta retenido en 4 superficies de dos tipos de materiales para almacenar/transportar tomate <sup>‡</sup>.

| Superficie                           | Prueba de reducción de azul de metileno | Prueba de Adherencia          |
|--------------------------------------|---|-------------------------------|
|                                      | Media $\pm$ DE                          | Media $\pm$ DE                |
| Gmelina                              | 1.31 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>            | 0.48 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>  |
| Pino                                 | 0.63 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>            | 0.54 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  |
| Plástico Azul                        | 1.63 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>            | 0.28 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup> |
| Plástico Negro                       | 1.19 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>            | 0.13 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>  |
| <b>Coefficiente de Variación (%)</b> | <b>27.49</b>                            | <b>62.17</b>                  |

<sup>‡</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).  
DE: Desviación estándar.

**Sobrevivencia de *Salmonella enterica*.** Todos los cultivos crecieron durante el periodo de reactivación de la cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y serovar Poona durante 3 siembras consecutivas de 24 horas a  $35 \pm 2$  °C. Alcanzando una concentración final para los inóculos con materia orgánica y sin materia orgánica de  $7.80 \pm 0.58$  y  $7.94 \pm 0.56$  log de UFC/ ml, respectivamente. Al momento de transferir estos inóculos a las superficies sus concentraciones disminuyeron (Cuadro 6); en él se puede apreciar como la maderas y el plásticos comenzaron con conteos iguales entre 3.30 y 4.60 Log UFC/superficie.

Cuadro 7: Concentraciones iniciales promedio de *Salmonella* spp. (Log UFC/superficie) sobre diferentes tipos de material para evaluar su sobrevivencia <sup>‡</sup>.

| Superficie                           | Con materia orgánica | Sin materia orgánica |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|
|                                      | Media $\pm$ DE       | Media $\pm$ DE       |
| Madera gmelina                       | $3.52 \pm 0.98^a$    | $3.51 \pm 0.12^a$    |
| Madera pino                          | $4.61 \pm 0.24^a$    | $3.78 \pm 0.82^a$    |
| Plástico azul                        | $4.25 \pm 0.70^a$    | $3.69 \pm 0.62^a$    |
| Plástico negro                       | $3.75 \pm 0.06^a$    | $3.37 \pm 0.61^a$    |
| <b>Coefficiente de variación (%)</b> | <b>13.69</b>         |                      |

<sup>‡</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P < 0.05)  
DE: Desviación estándar.

El tipo de superficie influyó en la sobrevivencia (P = 0.0003) de *S. enterica*. El menor tiempo de sobrevivencia se observó en madera pino, estadísticamente menor a las otras tres superficies ya que no se recuperó a partir del muestreo a los 12 días (Figura 4). En el plástico negro, plástico azul y la madera gmelina se observó el mismo tiempo de sobrevivencia, sobreviviendo hasta el final del estudio (16 días). Aun cuando el patógeno sobrevivió los 16 días, se pudieron observar diferencias significativas entre los materiales plásticos y la gmelina. Desde el día cuatro y hasta el final de estudio (día 16) los recuentos de *S. enterica* en materiales plásticos estuvieron por debajo del límite de cuantificación (<1.0 Log UFC/superficie) recuperándose solo aplicando enriquecimiento a la superficie total (límite de detección -0.69 Log UFC/superficie). En la madera gmelina si pudo ser cuantificada hasta el día 16.

La materia orgánica influyó en la sobrevivencia de *S. enterica* (P = 0.0079) haciendo que el patógeno fuese más difícil de recuperar de la superficie en presencia de materia orgánica (Cuadro 7). La temperatura no influyó en la sobrevivencia del patógeno (P = 0.5166). Finalmente la interacción de todos los factores superficie\*materia\*ambiente\*día si influyó en la sobrevivencia de *Salmonella enterica* (P = 0.0001).

A lo largo del periodo de 16 días en las tres repeticiones se observó que *Salmonella* spp. tuvo un comportamiento, estadísticamente, similar en madera que en plástico (Cuadro 8). Aunque este resultado fue sesgado en madera por el comportamiento que la bacteria tuvo

en pino, el cual reportó ausencia en varias repeticiones desde el día 4 (Figura 5), afectando así el promedio obtenido por el otro tipo de madera (gmelina).

La recuperación de *Salmonella enterica* en madera y plástico fue estadísticamente la misma a lo largo de los 16 días, a excepción del día 12. En el cual se recuperó mayor cantidad en madera, específicamente en gmelina que en plástico (Cuadro 8). Básicamente porque fue en este día donde hubo disminución de la cantidad de células recuperadas en plástico. La contaminación cruzada es una de las mayores preocupaciones en la industria de alimentos en relación al uso de ciertos materiales que podrían promover o evitar la misma (Jensen *et al.* 2013). Según recomendaciones hechas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA por sus siglas en inglés), se deberían de usar superficies no porosas como ser el plástico, el vidrio, el acero inoxidable y maderas de grano limítrofe que maderas de grano abierto, ejemplos de estas podrían ser el maple y el bambú. Evitar el uso de maderas en general (USDA 2013).

Cuadro 8: Influencia de la presencia/ ausencia de materia orgánica en la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en una periodo de 16 días. Expresado como Log UFC / superficie<sup>z</sup>.

| Materia orgánica                     | Día 0                    | Día 4                    | Día 8                    | Día 12                   | Día 16                   |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                      | Media ± DE               | Media ± DE               | Media ± DE               | Media ± DE               | Media ± DE               |
| Ausencia                             | 3.59 ± 0.43 <sup>b</sup> | 1.16 ± 0.83 <sup>a</sup> | 1.01 ± 0.73 <sup>a</sup> | 0.97 ± 0.87 <sup>a</sup> | 0.78 ± 0.60 <sup>a</sup> |
| Presencia                            | 4.03 ± 0.64 <sup>a</sup> | 0.78 ± 0.37 <sup>b</sup> | 0.81 ± 0.63 <sup>b</sup> | 0.68 ± 0.28 <sup>b</sup> | 0.62 ± 0.09 <sup>a</sup> |
| <b>Coefficiente de variación (%)</b> | <b>13.90</b>             | <b>59.39</b>             | <b>74.49</b>             | <b>61.02</b>             | <b>45.24</b>             |

<sup>z</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

DE: Desviación estándar.

Cuadro 9: Influencia del tipo de material en la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en una periodo de 16 días expresados como logaritmos de UFC / superficie<sup>z</sup>.

| Tipo                                 | Día 0                    | Día 4                    | Día 8                    | Día 12                   | Día 16                   |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                      | Media ± DE               | Media ± DE               | Media ± DE               | Media ± DE               | Media ± DE               |
| Madera                               | 3.95 ± 0.52 <sup>a</sup> | 0.99 ± 0.57 <sup>a</sup> | 0.96 ± 0.52 <sup>a</sup> | 0.99 ± 0.38 <sup>a</sup> | 0.72 ± 0.31 <sup>a</sup> |
| Plástico                             | 3.77 ± 0.46 <sup>a</sup> | 0.93 ± 0.77 <sup>a</sup> | 0.84 ± 0.66 <sup>a</sup> | 0.64 ± 0.34 <sup>b</sup> | 0.68 ± 0.36 <sup>a</sup> |
| <b>Coefficiente de variación (%)</b> | <b>13.49</b>             | <b>59.55</b>             | <b>59.17</b>             | <b>47.48</b>             | <b>47.51</b>             |

<sup>z</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P< 0.05).

DE: Desviación estándar.

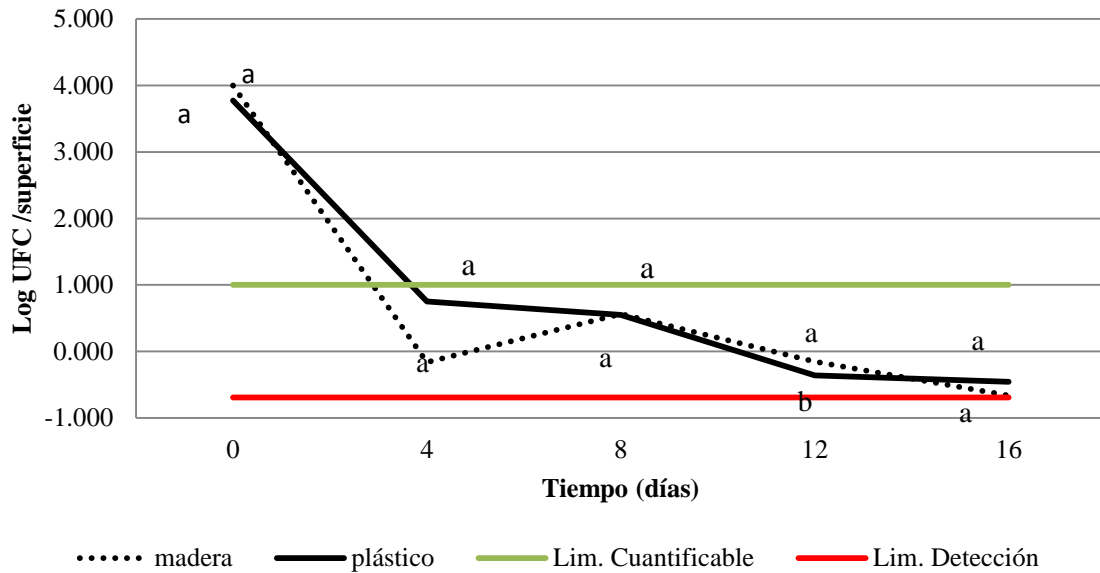


Figura 4: comportamiento promedio de *Salmonella enterica* en madera y plástico durante un periodo de 16 días<sup>‡</sup>.

<sup>‡</sup> Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

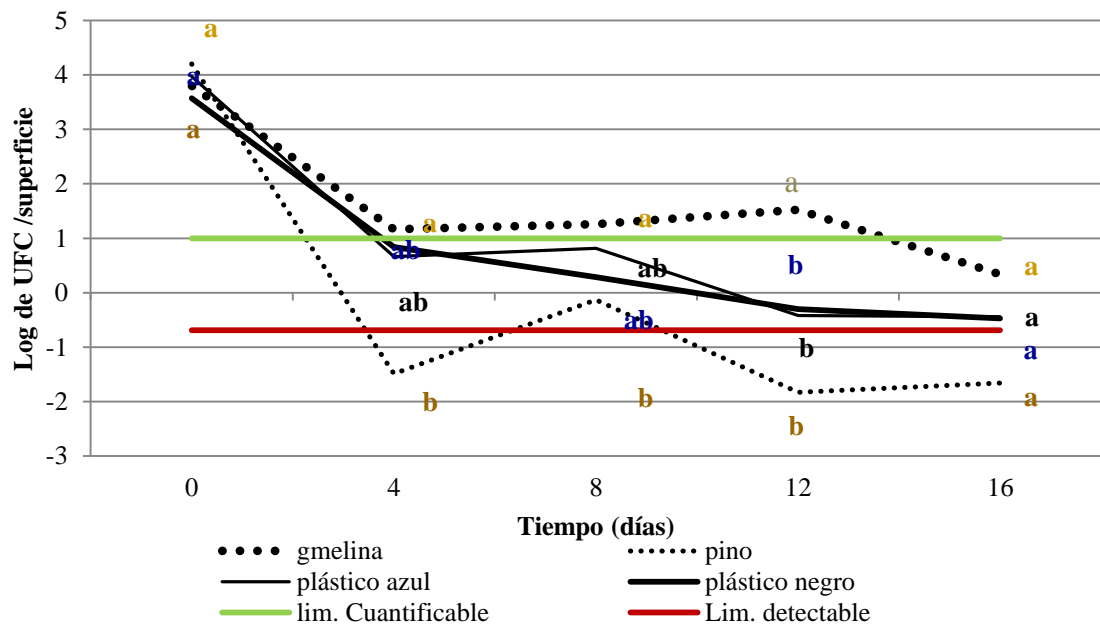


Figura 5: comportamientos de *Salmonella enterica* en cuatro superficies en un periodo de 16 días<sup>‡</sup>.

<sup>‡</sup> Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

La reducción logarítmica en madera fue de 2.95 log UFC/superficie y de 2.83 log UFC / superficie plástica del día cero al día cuatro. Esta reducción se podría deber a múltiples factores por ejemplo la cantidad de bacterias adheridas en el periodo de tiempo antes de ser recuperadas; el cual se calcula que fue de  $2.5 \pm 0.5$  horas hasta que las superficies estuvieran visiblemente secas, dando así espacio a que existieran mayor cantidad de bacterias en estado libre que asociado (en forma de biopelícula) en el día 0. Otro factor que pudo influir fue la cantidad de humedad presente en las superficies la cual al día cero era mayor que en los siguientes días. Ya que la humedad se pudo haber ido evaporando, estando así más húmeda al día cero que al día 16, dando lugar a mayor movilidad de las bacterias al tener mayor cantidad de agua en estas superficies. Estudios realizados demuestran que la interface de aire- líquido es donde mayor cantidad de bacterias son registradas (Giaouris y Nychas 2006), siendo esta interacción más fuerte, en este experimento, en el día cero que con el paso de los días. Esto es cierto cuando existe esta sección de interacción aire-líquido ya que en aquellos espacios donde hay mayor presencia de la fase acuosa se registra menor cantidad de bacterias que aquellas en las que es menor (Römling y Gerstel 2001). Otro factor que probablemente es el de mayor impacto sería la disponibilidad de materia orgánica, es decir nutrientes. Ya que con el paso de los días la cantidad disponible se fue agotando por el consumo de los mismos aumentando la competencia, la cual es intensa, y de la misma manera haciendo el medio más difícil para vivir por la producción de metabolitos tóxicos (Giaouris y Nychas 2006).

*S. enterica* se comportó de manera diferente en gmelina, en comparación al pino a lo largo de los 16 días comprendidos en el estudio. Ya que en gmelina *S. enterica* se mantuvo sobre el límite de detección hasta el día 16. Este mismo comportamiento no se observó con la madera de pino ya que en este material *Salmonella* spp. tuvo un comportamiento más inestable. En el día 4 en las tres repeticiones se reportó ausencia, pero volvió a ser detectada en el día 8, para ausentarse totalmente hasta el día 16 (Figura 6). Estas diferencias se pueden dar gracias a las características propias de la madera de pino que es alta en compuestos resinosos. Ya que existen estudios que demuestran la capacidad antimicrobiana que tienen las resinas y otros aceites esenciales presentes en las maderas que podrían llegar a causar este comportamiento de *Salmonella* spp. en la madera de pino. Un estudio realizado con 7 diferentes tipos de maderas muestra resultados comparables en los que *E. coli* y *E. faecium* en la madera de pino después de 24 horas presentaban ausencia. Comportamiento que fue diferente del árbol de haya en el cual se registró presencias de ambas bacterias hasta las 169 horas (Milling *et al.* 2005).

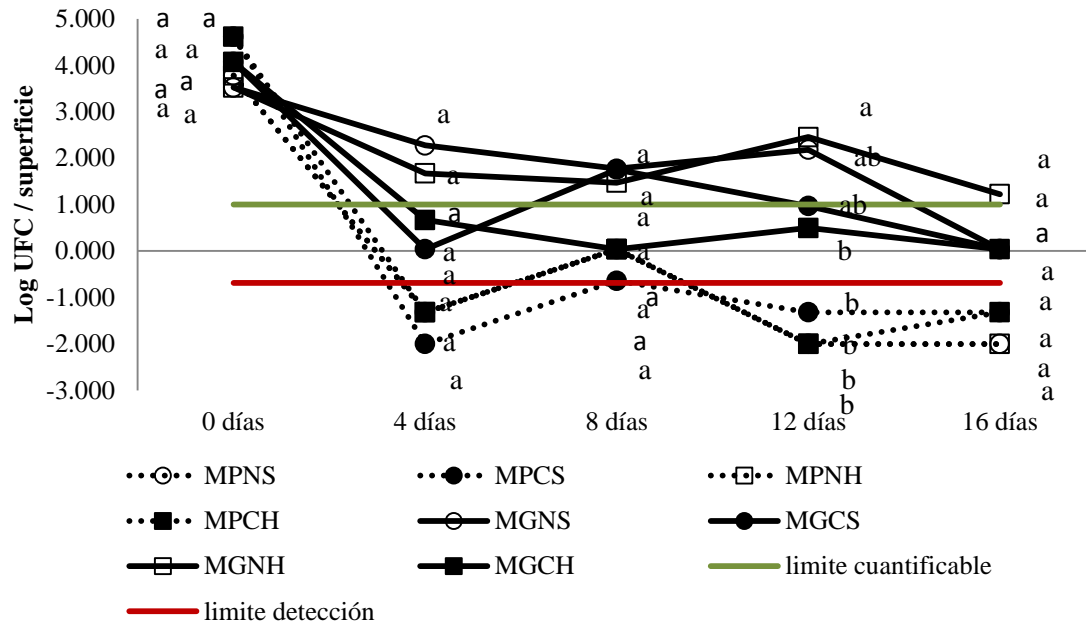


Figura 6: Comportamiento de *Salmonella enterica* en tratamientos utilizando dos superficies de tipo madera. Líneas continuas (gmelina) (MG) y líneas punteada (pino) (MP) en presencia de materia orgánica (símbolos rellenos) (C) y sin materia orgánica (símbolos abiertos) (N) a 30 °C (cuadros) (H) y a 21 °C (círculos) (S)<sup>3</sup>.

<sup>3</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P < 0.05).

En cuanto a plásticos al día 12 en dos tratamientos se reportó ausencia: en el plástico azul con materia orgánica en un ambiente seco y en el plástico negro con materia orgánica en un ambiente húmedo. Al final de los 16 días solo dos tratamientos reportaron presencia: plástico azul sin materia orgánica en un ambiente húmedo y el plástico negro sin materia orgánica en un ambiente húmedo (Figura 7). Esto muestra que el comportamiento en ambos plásticos es similar a lo largo del periodo que comprendió el estudio (Cuadro 7). Estudios comparando *E. coli* y *E. faecium* en maderas vs plásticos presenta que el mayor tiempo de sobrevivencia se da en un plástico ya que en un periodo de 260 horas aún se registró su presencia con cuatro log de UFC/ g (Milling *et al.* 2005).

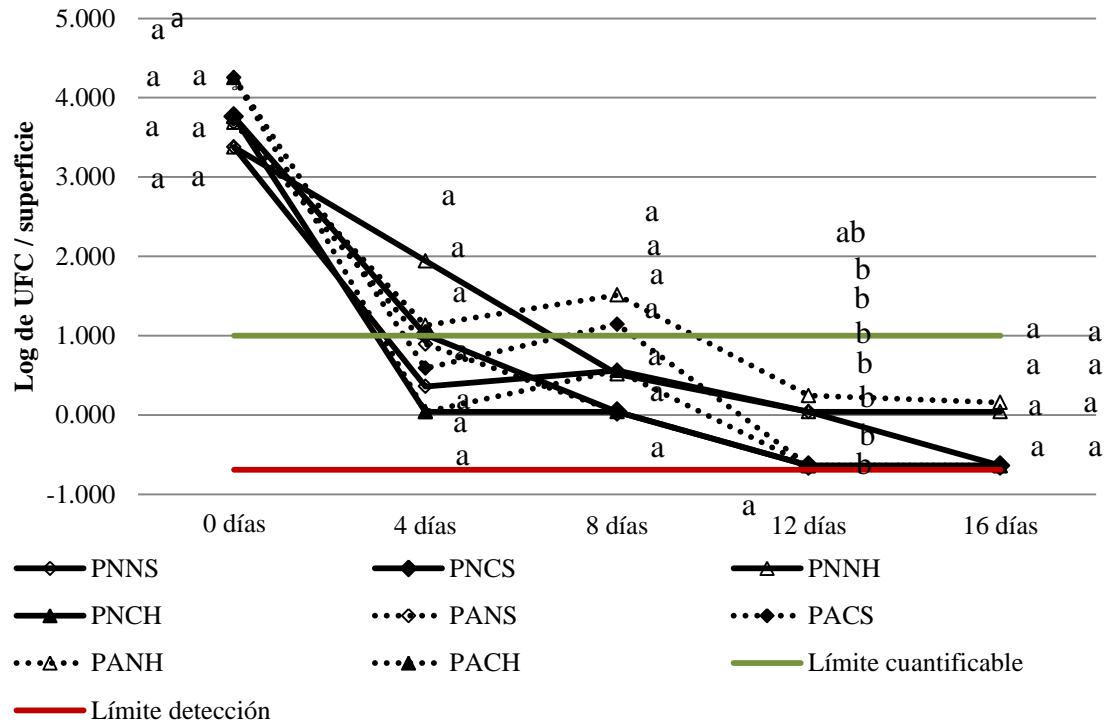


Figura 7: Comportamiento de *Salmonella enterica* en tratamientos utilizando dos superficies de tipo plásticos. Líneas continuas (plástico negro) (PN) y líneas punteada (plástico azul) (PA) en presencia de materia orgánica (símbolos rellenos) (C) y sin materia orgánica (símbolos abiertos) (N) en un ambiente a 30 °C (triángulos) (H) y a 21 °C (rombo) (S) <sup>‡</sup>.

<sup>‡</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P < 0.05)

A lo largo de los 16 días del estudio, en promedio se puede concluir que *Salmonella enterica* tiene mayor cantidad de recuperación en medios donde hay poca materia orgánica o medios pobres en nutrientes que en aquellos que tiene mayor disponibilidad de los mismos (Cuadro 7). Estos resultados concuerdan con los resultados reportados por Naves *et al.* en el 2008, quien evaluó el comportamiento de cuatro diferentes cepas de *E. coli* en las cuales 3 de ellas tuvieron una formación de biopelícula fuerte en aquellos medios pobres en nutrientes, en comparación a aquellos que eran concentrados o la concentración del medio comercial. Otros estudios realizados presentan resultados que podrían ser respuesta a la mayor recuperación de bacterias de medios con pocos nutrientes disponible que proponen que no necesariamente es que hubo menor cantidad de bacterias en aquellas superficies con presencia de materia orgánica, sino que los carbohidratos presentes en la matriz del alimento que entró en contacto con la superficie evaluada, hacen que las bacterias se adhieran con más fuerza a la misma, logrando un menor porcentaje de recuperación (Moore *et al.* 2007). También se han realizado experimentos en los que la renovación periódica de nutrientes durante 18 días logra aumentar en dos logaritmos la población bacteriana en la superficie, en comparación a aquellas en las que la cantidad de nutrientes disponibles no fue renovada. Demostrando así que la

disponibilidad de nutrientes es importante para el crecimiento de bacterias (Giaouris y Nychas 2006).

Los resultados muestran que a lo largo de los 16 días no hubo diferencias significativas en cuanto a la exposición de *Salmonella enterica* a dos diferentes ambientes. Uno a  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una humedad relativa de 28% y ambiente con una temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa de 16%. Con excepción al día cuatro en el que hubo una mayor cantidad de UFC/superficies en el ambiente húmedo que en el seco. Luego de este tiempo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 9). Los resultados no son significativamente diferentes ya que en este rango de temperatura *Salmonella* spp. suele tener un comportamiento similar bajo condiciones de aerobiosis; es decir el comportamiento que tiene *Salmonella* Typhimurium entre  $22\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$  no es muy variable. A temperatura ambiente se ha comprobado, que en un periodo de 24 horas, *Salmonella* ha creado una mayor cantidad de biopelícula fuertemente adherida en comparación a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  la cual se da en menor cantidad. A  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  la mayor cantidad de biopelícula en periodos de 24 y 48 horas se da mayormente una adherencia moderada. Lo cual es importante para la industria, enfatizando así en la necesidad de una limpieza periódica (Stepanovic *et al.* 2002).

La concentración de oxígeno si es un factor que tiene gran influencia en su comportamiento. Su efecto no fue evaluado en este experimento, razón por la cual su comportamiento en cuanto a la exposición a diferentes ambientes no tuvo mayor influencia. Se ha demostrado que la menor cantidad de biopelícula es formada en condiciones de anaerobiosis y la mayor cantidad en concentraciones altas en  $\text{CO}_2$  y microaerofílicas; en comparación a un ambiente aeróbico (Römling y Gerstel 2001). Estos factores son los que se encargan de promover la expresión del gen *agfD*, que es el gen responsable de inducir la formación de biopelícula. Para *Salmonella* Typhimurium se ha encontrado que a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  su comportamiento es dependiente de la temperatura. Pero no es lo mismo a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esto se da ya que el gen *agfD* se activa cuando las bacterias se encuentran en un medio donde existe limitación de nitrógeno y fosfatos. Estudios muestran que el efecto de la presencia de oxígeno tiene una influencia.

Para todos los tipos de superficies el factor más significativo fue el día. Básicamente esto se da en todas las superficies en la misma magnitud ya que desde el día cero hasta el día cuatro se dio una reducción logarítmica entre 2-3.5 UFC/superficie. Para gmelina el factor más significativo fue la materia orgánica. Como se pudo observar en la Figura 6, los tratamientos sin materia orgánica eran los que mostraron los mayores valores de recuperación en comparación a aquellos tratamientos donde no había materia orgánica (Figura 6). En cuanto a pino el factor de mayor significancia fue la interacción materia  $\times$  día, ya que este tuvo un comportamiento muy inestable a lo largo del periodo de 16 días. Para los dos tipos de plásticos no hubo significancia en ningún otro factor aparte del día (Cuadro 10).

Cuadro 10: Influencia del ambiente en la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en una periodo de 16 días<sup>z</sup>:

| <b>Ambiente</b>                      | <b>Día 0</b>             | <b>Día 4</b>             | <b>Día 8</b>             | <b>Día 12</b>            | <b>Día 16</b>            |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                      | Media ± DE               | Media ± DE               | Media ± DE               | Media ± DE               | Media ± DE               |
| 21 °C-28% Humedad                    | 3.81 ± 0.52 <sup>a</sup> | 0.97 ± 0.66 <sup>a</sup> | 0.95 ± 0.56 <sup>a</sup> | 0.82 ± 0.65 <sup>a</sup> | 0.73 ± 0.07 <sup>a</sup> |
| 30 °C- 16% Humedad                   | 3.81 ± 0.59 <sup>a</sup> | 0.95 ± 0.73 <sup>b</sup> | 0.85 ± 0.70 <sup>a</sup> | 0.82 ± 0.70 <sup>a</sup> | 0.67 ± 0.54 <sup>a</sup> |
| <b>Coefficiente de variación (%)</b> | <b>14.65</b>             | <b>73.49</b>             | <b>68.80</b>             | <b>83.82</b>             | <b>40.36</b>             |

<sup>z</sup>promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

DE: desviación estándar.

Cuadro 11: Nivel de significancia en la interacción de factores para cada tipo de superficie<sup>z</sup>.

| <b>Factor</b>      | <b>Gmelina</b> | <b>Pino</b> | <b>Plástico Azul</b> | <b>Plástico Negro</b> |
|--------------------|----------------|-------------|----------------------|-----------------------|
|                    | Valor P        | Valor P     | Valor P              | Valor P               |
| Materia orgánica   | 0.0001         | 0.0007      | 0.8324               | 0.3918                |
| ambiente           | 0.8742         | 0.8954      | 0.5343               | 0.4994                |
| día                | 0.0001         | 0.0001      | 0.0001               | 0.0001                |
| materia × día      | 0.0207         | 0.0001      | 0.1187               | 0.9868                |
| Materia × ambiente | 0.1463         | 0.8954      | 0.9751               | 0.0709                |

<sup>z</sup>(P< 0.05) representan factores con influencia significativa en superficie.

DE: Desviación estándar.

## CONCLUSIONES

- *Salmonella enterica* forma biopelículas tanto en los materiales de plástico como en madera utilizados en el transporte de tomate. Hubo una adherencia fuerte en madera de pino y madera gmelina, una adherencia moderada en plástico azul y una débil en plástico negro. La cantidad de bacterias fue mayor en pino seguida por el resto de superficies entre las cuales no hubo diferencias estadísticas.
- La madera de Gmelina es la superficie con mayor capacidad de retener mayor cantidad de bacterias en 16 días. La madera de pino tuvo un efecto antimicrobiano para *Salmonella enterica*. En las dos superficies de plástico se determinó la presencia de *Salmonella* en niveles no cuantificables, pero si detectables.
- Los factores evaluados en el experimento que tuvieron mayor influencia en el comportamiento de *Salmonella enterica* fueron los tipos de superficies y la presencia o ausencia de materia orgánica. La especie Gmelina presentó la de mayor cantidad de log de UFC/ superficie y el pino la de menor cantidad. En cuanto a la materia orgánica se recuperó mayor cantidad de bacterias de aquellas superficies en las que no había presencia de la misma.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda, basados en la adherencia de *S. enterica*, utilizar el diseño de la “Cesta One- way” como material para transportar y almacenar tomates.
- La limpieza debe de ser llevada a cabo lo antes posible para evitar la formación de biopelícula después de haber sido usada. Métodos más abrasivos deben ser usados para la madera.
- Implementar buenas prácticas agrícolas (BPA) y procedimientos operativos estandarizados de saneamiento (POES), desde la cosecha en campo hasta el almacenamiento y transporte de los tomates.
- Se debe de tener especial cuidado con la madera de pino ya que si bien no se reportó alta presencia del patógeno en la superficie, este comportamiento no fue estable durante todo el experimento.
- Se recomienda evaluar diferentes soluciones limpiadoras y desinfectantes que eliminen a *Salmonella enterica* de este tipo maderas y plásticos.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de resinas sobre estas superficies y su tiempo de efecto.

## LITERATURA CITADA

Abban, S., M. Jakobsen y L. Jaspersen. 2012. Attachment behavior of *Escherichia coli* K12 and *Salmonella* Typhimurium P6 on food contact surfaces for food transportation. *Journal Food microbiology*. 31, 139-147.

Adam, G. y H. Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Journal Soil Biology and Biochemistry*. 33, 943–951.

Bouloset, L., M. Prévost, B. Barbeau, J.Coallier y R. Desjardins. 1999. LIVE/ DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*. 37, 77–86.

Bridier, A., P. Sanchez-Vizueté, M. Guilbaud, J. Piard, M. Naïtali y R. Briandet. 2014. Biofilm associated persistence of food-borne pathogens, *Food Microbiology*.10, 10-16.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2012. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID) Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). Versión en español. (En línea). Consultado el 11/06/2014. Disponible en:  
[http://www.cdc.gov/nczved/es/enfermedades/infecciones\\_alimentos#contamina](http://www.cdc.gov/nczved/es/enfermedades/infecciones_alimentos#contamina)

Cliver, D. 2006. Plastic and wooden cutting boards. Publicación en línea: [faculty.vetmed.ucdavis.edu/faculty/docliver/Research/cuttingboard.htm](http://faculty.vetmed.ucdavis.edu/faculty/docliver/Research/cuttingboard.htm)

Coenye, T. y H. Nelis. 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 83, 89–105.

Christensen, G., W. Simpson, J. Younger, L. Baddour, F. Barrett., D. Melton y E. Beachey. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 22, 996–1006.

Davey, M. y G. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology Molecular Biology Review*. 64, 847–867.

Donlan, R. y J. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology Review*. 15, 167–193.

Enobakhare, B., D. Bader y D. Lee. 1996. Quantification of sulfated glycosaminoglycans in chondrocyt/alginate cultures, by use of 1,9- dimethylmethylene blue. *Journal of Analysis and Biochemistry*. 243, 189–191.

Gabrielson, J., M. Hart, A. Jarelöv, I. Kühn, D. McKenzie y R. Möllby. 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiology Methods*. 50, 63–73.

Guidance for Industry Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables Food Safety. 1998. DC U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN).

Giaouris, E. y G. Nychas, 2006. The adherence of *Salmonella Enteritidis* PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*. 23, 747–752.

Guiney, D. 1997. Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. *Journal of Clinical Investigation*. 99, 565–569.

Jensen, D., Friederich, L., Harris, L., Danyluk, M. y Schaffner, D. 2013. Quantifying Transfer Rates of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 between Fresh-Cut Produce and Common Kitchen Surfaces. *Journal of Food Protection*. 76, 1530–1538.

Kroupitski, Y., R. Pinto, E. Belausov y S. Sela. 2011. Distribution of *Salmonella* Typhimurium in romaine lettuce leaves. *Journal of Food Microbiology*. 28. 990-997

Jensen, D., L. Friedrich, L. Harris, M. Danyluk y D. Schaffner. 2013. Quantifying Transfer rates of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 between fresh-cut produce and common kitchen surfaces. *Journal of Food Protection*. 76, 1530-1538.

Macfaddin J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. *Editoial médica Panamericana*. Pág. 296.

Milling, A., R. Kehr, A. Wulf y K. Smalla. 2005. Survival of bacteria on wood and plastic particles: dependence on wood species and environmental conditions. *Holzforshcung*. 59, 72- 81.

Moore, G., I. Blair y D. McDowell. 2007. Recovery and transfer of *Salmonella* Typhimurium from four different domestic food contact surfaces. *Journal of Food Protection*. 70, 2273-2280.

Naves, P., G. Prado, L. Huelves, M. Gracia, V. Ruiz, J. Blanco, V. Rodríguez-Cerrato, M. Ponte y F. Soriano. 2008. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology*. 105, 585–590.

O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton y F. Pognan. 2000. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 267, 5421–5426.

Olaimat, A. y R. Holley. 2012 Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review: *Journal of Food Microbiology*. 32, 1-19.

- Römling, U., M. Rohde, A. Olsén, S. Normark y J. Reinköster. 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Journal of Molecular Microbiology*. 36, 10-23
- Römling, U. y U. Gerstel. 2001. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Environmental Science*. 3, 638- 648.
- Sant'Ana, A., B. Franco y W. Schaffner. 2011. Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. *Journal of Food Microbiology*. 30, 267-273.
- Sinde, E. y J. Carballo. 2000. Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Journal of Food Microbiology*. 17, 43-47.
- Soares, V., J. Pereira, C. Viana, T. Izidoro, S. Bersot y J. Pinto. 2012. Transfer of *Salmonella enteritidis* to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. *Journal of Food Microbiology*. 30, 453-456.
- Stepanović, S, I. Ćirković, V. Mijač y M. Švabić-Vlahović. 2002. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella spp.* *Journal of Food Microbiology*. 20, 339-343.
- Sutherland, I. 2001. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends of Microbiology*. 9, 222–227.
- Trinetta, V., M. Morgan y R. Linton. 2010. Use of high-concentration-short-time chlorine dioxide gas treatments for the inactivation of *Salmonella enterica spp.* inoculated onto Roma tomatoes. *Journal of Food Microbiology*. 27, 1009-1015.
- Ukuku, D. y G. Sapers. 2007. Effect of time before storage and storage temperature on survival of *Salmonella* inoculated on fresh-cut melons. *Food Microbiology*. 24, 288–295.
- United States Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Services. 2013. Cutting boards and food safety. Food Safety information.revised on 2013. Online resource.[http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/ffab12f8-7762-4bd1-a6f6-d8d08a33948f/Cutting\\_Boards\\_and\\_Food\\_Safety.pdf?MOD=AJPERES](http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/ffab12f8-7762-4bd1-a6f6-d8d08a33948f/Cutting_Boards_and_Food_Safety.pdf?MOD=AJPERES).
- Wang, H. y E. Ryser. 2013, *Salmonella* transfer during pilot plant scale washing and roller conveying of tomatoes. *Journal of Food Protection*. 77, 380 – 387.
- Xiaogang, L., Z. Yan y J. Xu. 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*. 149, 353–362.

## ANEXOS

Anexo 1: Reducción y adherencia de *Salmonella enterica* en cuatro superficies <sup>‡</sup>.

| <b>Superficie</b> | <b>Reducción</b>         | <b>Adherencia</b>         |
|-------------------|--------------------------|---------------------------|
|                   | MEDIA ± DE               | MEDIA ± DE                |
| Pino              | 0.63 ± 0.25 <sup>b</sup> | 0.54 ± 0.04 <sup>a</sup>  |
| Gmelina           | 1.31 ± 0.46 <sup>a</sup> | 0.48 ± 0.14 <sup>a</sup>  |
| Plástico Azul     | 1.63 ± 0.19 <sup>a</sup> | 0.28 ± 0.33 <sup>ab</sup> |
| Plástico Negro    | 1.19 ± 0.26 <sup>a</sup> | 0.13 ± 0.12 <sup>c</sup>  |
|                   | CV: 4.57                 | CV: 4.39                  |

<sup>‡</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

DE: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación.

Anexo 2: Supervivencia de *Salmonella enterica* (Log UFC/superficie) en dos tipos de materiales utilizados para el transporte y almacenamiento <sup>‡</sup>

| <b>Tipo</b>                                  | <b>Día 0</b>             | <b>Día 4</b>             | <b>Día 8</b>             | <b>Día 12</b>            | <b>Día 16</b>            |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|  | MEDIA ±<br>DE            | MEDIA ±<br>DE            | MEDIA ±<br>DE            | MEDIA ±<br>DE            | MEDIA ±<br>DE            |
| Madera                                       | 3.95 ± 0.48 <sup>a</sup> | 0.99 ± 0.59 <sup>a</sup> | 0.96 ± 0.50 <sup>a</sup> | 0.99 ± 0.67 <sup>a</sup> | 0.72 ± 0.35 <sup>a</sup> |
| Plástico                                     | 3.77 ± 0.33              | 0.93 ± 0.44 <sup>a</sup> | 0.84 ± 0.40 <sup>a</sup> | 0.64 ± 0.23 <sup>b</sup> | 0.68 ± 0.23 <sup>a</sup> |
| <b>Coefficiente<br/>de variación<br/>(%)</b> | <b>10.72</b>             | <b>49.68</b>             | <b>43.98</b>             | <b>52.31</b>             | <b>39.55</b>             |

<sup>‡</sup>promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

DE: Desviación estándar.

Anexo 3: Influencia de cuatro diferentes superficies en la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en una periodo de 16 días. Expresados como log de UFC /superficie<sup>z</sup>.

| <b>Superficie</b>            | <b>Día 4</b>              | <b>Día 8</b>              | <b>Día 12</b>            | <b>Día 16</b>            |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                              | MEDIA ± DE                | MEDIA ± DE                | MEDIA ± DE               | MEDIA ± DE               |
| Gmelina                      | 1.32 ± 0.64 <sup>a</sup>  | 1.40 ± 0.72 <sup>a</sup>  | 1.48 ± 0.78 <sup>a</sup> | 0.90 ± 0.54 <sup>a</sup> |
| Pino                         | 0.06 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 0.69 ± 0.05 <sup>b</sup>  | 0.69 ± 0.05 <sup>b</sup> | 0.69 ± 0.07 <sup>a</sup> |
| Plástico Azul                | 1.15 ± 0.90 <sup>ab</sup> | 1.14 ± 0.99 <sup>ab</sup> | 0.85 ± 0.60 <sup>b</sup> | 0.94 ± 0.64 <sup>a</sup> |
| Plástico Negro               | 1.16 ± 0.64 <sup>ab</sup> | 0.83 ± 0.33 <sup>ab</sup> | 0.69 ± 0.07 <sup>b</sup> | 0.69 ± 0.09 <sup>a</sup> |
| Coeficiente de variación (%) | 76.65                     | 46.35                     | 35.53                    | 37.49                    |

<sup>z</sup> promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P < 0.05)

DE: Desviación estándar.

Anexo 4: Comportamiento promedio de *Salmonella enterica* (Log UFC/superficie) en el día 0 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H)<sup>§</sup>.

| <b>Día 0</b> |             |                          |       |
|--------------|-------------|--------------------------|-------|
| #            | TRATAMIENTO | MEDIA ± DE               | CV(%) |
| 1            | MPCH        | 4.61 ± 0.18 <sup>a</sup> | 3.80  |
| 2            | MPCS        | 4.61 ± 0.18 <sup>a</sup> | 3.80  |
| 3            | PACH        | 4.25 ± 0.50 <sup>a</sup> | 11.65 |
| 4            | PACS        | 4.25 ± 0.50 <sup>a</sup> | 11.65 |
| 5            | MPNH        | 3.78 ± 0.58 <sup>a</sup> | 15.34 |
| 6            | MPNS        | 3.78 ± 0.58 <sup>a</sup> | 15.34 |
| 7            | PNCH        | 3.76 ± 0.05 <sup>a</sup> | 1.24  |
| 8            | PNCS        | 3.76 ± 0.05 <sup>a</sup> | 1.24  |
| 9            | PANH        | 3.69 ± 0.44 <sup>a</sup> | 11.92 |
| 10           | PANS        | 3.69 ± 0.44 <sup>a</sup> | 11.92 |
| 11           | MGCH        | 3.52 ± 0.98 <sup>a</sup> | 27.97 |
| 12           | MGCS        | 3.52 ± 0.98 <sup>a</sup> | 27.97 |
| 13           | MGNH        | 3.51 ± 0.12 <sup>a</sup> | 3.43  |
| 14           | MGNS        | 3.51 ± 0.12 <sup>a</sup> | 3.43  |
| 15           | PNNH        | 3.37 ± 0.62 <sup>a</sup> | 18.34 |
| 16           | PNNS        | 3.37 ± 0.62 <sup>a</sup> | 18.34 |

<sup>§</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

HR: Humedad relativa

DE: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación.

Anexo 5: Comportamiento promedio de *Salmonella enterica* (Log UFC/superficie) en el día 4 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) y dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H) %.

| <b>Día 4</b> |             |                          |        |
|--------------|-------------|--------------------------|--------|
| #            | TRATAMIENTO | MEDIA                    | CV (%) |
| 1            | MGNS        | 2.05 ± 0.39 <sup>a</sup> | 19.05  |
| 2            | PNNH        | 1.94 ± 0.56 <sup>a</sup> | 28.73  |
| 3            | MGNH        | 1.68 ± 0.37 <sup>a</sup> | 22.05  |
| 4            | PANH        | 1.56 ± 1.51 <sup>a</sup> | 96.97  |
| 5            | PANS        | 1.32 ± 1.10 <sup>a</sup> | 83.54  |
| 6            | PNCS        | 1.23 ± 0.68 <sup>a</sup> | 55.66  |
| 7            | PACS        | 1.02 ± 0.58 <sup>a</sup> | 56.60  |
| 8            | MGCH        | 0.89 ± 0.35 <sup>a</sup> | 39.57  |
| 9            | PNNS        | 0.79 ± 0.18 <sup>a</sup> | 22.66  |
| 10           | MPCH        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |
| 11           | PACH        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 12           | MGCS        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 13           | PNCH        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 14           | MPCS        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 15           | MPNH        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |
| 16           | MPNS        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |

<sup>a</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

HR: Humedad relativa

DE: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación.

Anexo 6: Comportamiento promedio de *Salmonella enterica* (Log UFC/superficie) en el día 8 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) y dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H)<sup>3</sup>

| <b>Día 8</b> |             |                          |        |
|--------------|-------------|--------------------------|--------|
| #            | TRATAMIENTO | MEDIA                    | CV (%) |
| 1            | MGNH        | 1.76 ± 1.11 <sup>a</sup> | 62.86  |
| 2            | MGNS        | 1.74 ± 0.08 <sup>a</sup> | 4.65   |
| 3            | PANH        | 1.73 ± 1.31 <sup>a</sup> | 75.67  |
| 4            | PACS        | 1.57 ± 1.54 <sup>a</sup> | 97.82  |
| 5            | MGCS        | 1.40 ± 0.68 <sup>a</sup> | 48.41  |
| 6            | PACH        | 0.99 ± 0.53 <sup>a</sup> | 53.07  |
| 7            | PNNS        | 0.99 ± 0.53 <sup>a</sup> | 53.07  |
| 8            | PNNH        | 0.95 ± 0.45 <sup>a</sup> | 47.40  |
| 9            | MPCH        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 10           | MPCS        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |
| 11           | MGCH        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 12           | PANS        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 13           | PNCH        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 14           | PNCS        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 15           | MPNH        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 16           | MPNS        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |

<sup>3</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

HR: Humedad relativa

DE: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación.

Anexo 7: Comportamiento promedio de *Salmonella enterica* (Log UFC/superficie) en el día 12 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) y dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H).<sup>‡</sup>

| <b>Día 12</b> |             |                      |        |
|---------------|-------------|----------------------|--------|
| #             | TRATAMIENTO | MEDIA                | CV (%) |
| 1             | MGNH        | $2.17 \pm 0.78^a$    | 35.98  |
| 2             | MGNS        | $1.88 \pm 0.58^{ab}$ | 30.86  |
| 3             | PANH        | $1.35 \pm 1.21^{ab}$ | 89.87  |
| 4             | MGCS        | $1.09 \pm 0.70^{ab}$ | 64.09  |
| 5             | MGCH        | $0.77 \pm 0.15^b$    | 19.79  |
| 6             | MPCS        | $0.69 \pm 0.11^b$    | 15.90  |
| 7             | MPCH        | $0.69 \pm 0.00^b$    | 0.00   |
| 8             | MPNS        | $0.69 \pm 0.00^b$    | 0.00   |
| 9             | PACH        | $0.69 \pm 0.11^b$    | 15.90  |
| 10            | PACS        | $0.69 \pm 0.11^b$    | 15.90  |
| 11            | MPNH        | $0.69 \pm 0.00^b$    | 0.00   |
| 12            | PANS        | $0.69 \pm 0.11^b$    | 15.90  |
| 13            | PNCH        | $0.69 \pm 0.11^b$    | 15.90  |
| 14            | PNCS        | $0.69 \pm 0.11^b$    | 15.90  |
| 15            | PNNH        | $0.69 \pm 0.00^b$    | 0.00   |
| 16            | PNNS        | $0.69 \pm 0.00^b$    | 0.00   |

<sup>‡</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ )

HR: Humedad relativa

DE: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación.

Anexo 8: Comportamiento promedio de *Salmonella enterica* (Log UFC/superficie) en el día 16 en tratamientos utilizando cuatro superficies: madera gmelina (MG), madera pino (MP), plástico azul (PA) y plástico negro (PN), dos niveles de materia orgánica: presencia (C) y ausencia (N) y dos ambientes: 21 °C/ 28% HR (S) y 30 °C/ 16% HR (H).<sup>‡</sup>

| <b>Día 16</b> |             |                          |        |
|---------------|-------------|--------------------------|--------|
| #             | TRATAMIENTO | MEDIA                    | CV (%) |
| 1             | MGNH        | 1.56 ± 0.86 <sup>a</sup> | 55.16  |
| 2             | PANH        | 1.27 ± 1.06 <sup>a</sup> | 83.76  |
| 3             | PANS        | 1.12 ± 0.82 <sup>a</sup> | 72.92  |
| 4             | MGCS        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 5             | MGCH        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 6             | MPCS        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |
| 7             | MPCH        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |
| 8             | MPNS        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 9             | PACH        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |
| 10            | PACS        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |
| 11            | MPNH        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 12            | MGNS        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 13            | PNCH        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |
| 14            | PNCS        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |
| 15            | PNNH        | 0.69 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.00   |
| 16            | PNNS        | 0.69 ± 0.11 <sup>a</sup> | 15.90  |

<sup>‡</sup>Promedios con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

HR: Humedad relativa

DE: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación.