

Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas de *Salmonella* spp. aislada de aguacate Hass de mercados minoristas de Guadalajara, México

Novoa-Valdovinos, C.¹, Gutiérrez-Lomelí, M.¹, Velázquez-Suarez N.Y.¹, García-Frutos, R.³, Martínez-Chávez, L.², Martínez-González, N.E.², González-López A.Y.¹, Olvera Pimentel L.E.¹, Ávila-Novoa M.G.¹

¹Laboratorio de Alimentos, Departamento de Ciencias Médicas y de la Vida, Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115, Col. Lindavista, 47820, Ocotlán. Jal, México. ² Departamentos de Farmacobiología y Matemáticas, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Marcelino García Barragán 1451, 44430, Guadalajara, Jal, México. ³ Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional, Justo Sierra No. 28, Jiquilpan, Michoacán 59510, México. Correo: carolina.novoa@alumnos.udg.mx

Palabras clave: biopelícula, nutriente, cepa

Introducción

Salmonella es un género bacteriano perteneciente a la familia Enterobacteriaceae responsable de causar gastroenteritis, cuya sintomatología puede variar de leve a grave en las personas. En la mayoría de ellas, produce cuadros autolimitados, permitiendo su recuperación dentro de 4 a 7 días sin tratamiento. Sin embargo, en otros casos, la infección puede ser grave y requerir hospitalización o incluso ser mortal. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estima que cada año *Salmonella* spp causa alrededor de 1.35 millones de infecciones, 26,500 hospitalizaciones y 420 muertes en los Estados Unidos Americanos (EUA), de hecho en dicho país la salmonelosis es la segunda causa principal de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Aunado a esto existen notificaciones de alertas sanitarias y decomisos de productos del mercado, por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA, por sus siglas en inglés) asociadas a productos agrícolas frescos como son las variedades de aguacates [1]. De hecho, en los acontecimientos sucedidos en 2008, 2014 y 2018, el aguacate fue el vehículo implicado en el que se detectó *Salmonella* spp en productos de procedencia mexicana y nacional (de EUA), lo que provocó el retiro voluntario de los lotes exportados a EUA, así como la decomisación del producto nacional implicado [2,3].

Por otro lado, según la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), con un 39% del total de comercio mundial, México es el primer país exportador de aguacate, es líder mundial en ventas internacionales (Estados Unidos Americanos, Japón y Canadá); a nivel nacional el estado de Michoacán es el primer productor (con más del 80% de la producción), seguido de Jalisco (6.6%), Estado de México (4.3%) y Morelos (2.4%); de las siete variedades comerciales existentes de aguacate (Fuerte, Criollo, Bacón, Pinkerton, Gwen, Reed y Hass) la variedad Hass es la de mayor demanda en el mercado nacional e internacional [4]. Los aguacates Hass pueden contaminarse con *Salmonella* durante cualquier punto de la cadena productiva, ya sea durante su cultivo, cosecha, envasado, almacenamiento, transporte y /o venta; son diversas las posibles fuentes de contaminación, incluyen agua, suelo, insectos, animales, humanos, equipos y utensilios. En particular, en México, los aguacates se venden con frecuencia a granel en los mercados minoristas, donde son manipulados por vendedores y compradores, se almacenan a temperatura ambiente durante varias horas o días y se exponen a posibles fuentes de contaminación. Estas condiciones pueden favorecer la presencia, supervivencia, adhesión, desarrollo, y formación de biopelículas de *Salmonella* [3].

Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie; son una estrategia adaptativa de los microorganismos, principalmente le confieren cuatro ventajas importantes al microorganismo: (I) protegen a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (II) incrementan la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (III) facilitan el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (IV) posibilitan la transferencia de material genético (ADN). Estas circunstancias incrementan sus capacidades de sobrevivencia en ambientes hostiles y disminuye la eficiencia de

procedimientos operativos estándares de saneamiento o tratamientos químicos, por lo que las biopelículas representan una fuente de contaminación persistente en alimentos y superficies de contacto con esto, lo que genera pérdidas económicas por retiros alimentarios, implicaciones a la salud pública y problemas en procedimientos y equipos dentro de la industria alimentaria [5]. Sin embargo, el mecanismo y los factores implícitos, extrínsecos e intrínsecos implicados en la formación de biopelículas de *Salmonella* son complejos, por lo que generar información sobre las biopelículas es una pauta importante para la implementación de estrategias para el control de biopelículas dentro de la industria alimentaria. Por ello, el objetivo de esta investigación es evaluar la capacidad de formación de biopelículas de *Salmonella* spp. aislada de aguacate Hass de mercados minoristas de Guadalajara, México.

Metodología

Cepario.- Un total de 39 cepas de *Salmonella* provenientes de aguacates Hass de mercados minoristas de Guadalajara, México, fueron aisladas y caracterizadas por García-Frutos et al. (2020) [6]. El aislamiento de *Salmonella* se realizó sobre Agar de xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar entérico Hektoen (HE) y agar sulfito de bismuto (BS); después de la incubación durante 24 a 48 h a 35 ° C, los aislamientos se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales y se confirmaron con PCR. Las cepas se almacenaron a -80 ° C en caldo soja tripticaseína (TSB) con 30% de glicerol. Los cultivos axénicos iniciales se reactivaron en TSB durante 24 h a 35 ° C para obtener una concentración final de 10⁸ UFC / mL.

Ensayos de formación de biopelículas de *Salmonella* spp.-La capacidad de formación de biopelículas se realizó en microplacas de poliestireno de 96 pocillos, utilizando el método de ensayo cristal violeta (CV) con algunas modificaciones [7]. Se utilizaron dos medios de cultivo [TSB y Luria Bertani (LB)] y se estableció una temperatura de incubación a 35 ° C para la formación de biopelículas de *Salmonella* spp. Inicialmente se incorporan 230 µL del medio de cultivo correspondiente + 20 µL de suspensión bacteriana (~ 10⁸ UFC / mL) de cada cepa de *Salmonella* spp en la microplaca de poliestireno por triplicado. Las microplacas de poliestireno se incubaron a 35°C durante 48 h. Adicionalmente se utilizó un control positivo (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028) y control negativo (TSB y LB sin inocular). Después del periodo de incubación de 48 h se retiró el contenido de cada pocillo, realizando tres lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar las células planctónicas. Posteriormente las células bacterianas adheridas se fijaron con 250 µL de metanol durante 15 min. El contenido de las microplacas se vierten y se dejan secar tiñéndose a continuación con 250 µL de solución de violeta cristal (CV) al 1% (p / v) a cada uno de los pocillo durante 5 min. El exceso de colorante se enjuagó con agua destilada estéril y las microplacas se secaron al aire. Después de eso, el colorante unido a las células bacterianas adherentes se resolubilizó usando 250 µL de ácido acético glacial al 33% (v / v) por pocillo y se determinó la densidad óptica (DO) de cada pocillo a una lectura de 570 nm (DO₅₇₀). Por último, el corte de la DO (DOc) se define como tres desviaciones estándar por encima de la media de DO del control negativo. Con base en la DO de las biopelículas bacterianas, las cepas se clasificaron en las siguientes categorías: no productoras de biopelículas (DO ≤ DOc), débiles productoras de biopelículas (DOc < DO ≤ (2 x DOc)), moderadas productoras de biopelículas ((2 x DOc) < DO ≤ (4 x DOc)) y fuertes productoras de biopelícula ((4 x DOc) < DO).

Análisis estadístico.- Los experimentos se evaluaron con un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de diferencia mínima significativa (LDS) mediante el programa de software Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE. UU.).

Resultados y discusión

En esta investigación se determinó que el 100% de las cepas analizadas de *Salmonella* spp fueron formadoras de biopelículas en el medio TSB, mientras que en el LB sólo el 64% de las cepas resultaron formadoras de biopelículas ($p < 0.5$) (Tabla 1).

Tabla 1. Formación de biopelículas de cepas de *Salmonella* mediante ensayo cristal violeta con modificaciones

Cepa de <i>Salmonella</i>	Medio de crecimiento		Clasificación de cepas	
	TSB (DO)	LB (DO)	TSB	LB
636	0.043±0.004 ^{bc}	0.043±0.000 ^{abcde}	+	+
637	0.042±0.001 ^{bc}	0.043±0.000 ^{abcd}	+	+
638	0.051±0.010 ^{ef}	0.043±0.004 ^{abcd}	+	+
639	0.043±0.000 ^{bc}	0.040±0.000 ^{ab}	+	0
640	0.050±0.012 ^{def}	0.041±0.000 ^{abcd}	+	0
641	0.046±0.005 ^{bcde}	0.040±0.000 ^{abc}	+	0
735	0.045±0.002 ^{bcde}	0.043±0.002 ^{abcd}	+	+
737	0.043±0.001 ^{bc}	0.046±0.002 ^{def}	+	+
742	0.044±0.002 ^{bcd}	0.043±0.001 ^{abcd}	+	+
744	0.048±0.003 ^{bcde}	0.041±0.000 ^{abcd}	+	0
745	0.049±0.005 ^{cdef}	0.043±0.002 ^{abcd}	+	+
747	0.044±0.001 ^{bcde}	0.043±0.002 ^{abcde}	+	+
554	0.043±0.002 ^{bc}	0.043±0.001 ^{abcd}	+	+
559	0.043±0.002 ^{bc}	0.045±0.000 ^{bcde}	+	+
635	0.044±0.001 ^{bcd}	0.042±0.001 ^{abcd}	+	0
748	0.043±0.001 ^{bc}	0.042±0.003 ^{abcd}	+	0
749	0.046±0.002 ^{bcde}	0.042±0.003 ^{abcd}	+	0
752	0.043±0.002 ^{bc}	0.043±0.002 ^{abcd}	+	+
753	0.056±0.014 ^f	0.043±0.001 ^{abcd}	+	+
754	0.043±0.004 ^{bcd}	0.042±0.003 ^{abcd}	+	0
755	0.043±0.003 ^{bcd}	0.041±0.002 ^{abcd}	+	0
766	0.046±0.002 ^{bcde}	0.042±0.000 ^{abcd}	+	0
768	0.044±0.001 ^{bcd}	0.044±0.003 ^{abcde}	+	+
771	0.043±0.002 ^{bc}	0.041±0.000 ^{abcd}	+	0
750	0.043±0.001 ^{bc}	0.045±0.001 ^{bcde}	+	+
760	0.041±0.000 ^{ab}	0.043±0.002 ^{abcd}	+	+
761	0.046±0.004 ^{bcde}	0.044±0.003 ^{abcde}	+	+
763	0.048±0.003 ^{bcde}	0.052±0.002 ^g	+	+
764	0.048±0.006 ^{bcde}	0.045±0.005 ^{cdef}	+	+
557	0.043±0.002 ^{bcd}	0.041±0.002 ^{abcd}	+	0
736	0.043±0.001 ^{bc}	0.050±0.009 ^{fg}	+	+
733	0.047±0.002 ^{bcde}	0.051±0.007 ^g	+	+
740	0.046±0.003 ^{bcde}	0.048±0.009 ^{efg}	+	+
730	0.042±0.001 ^{bc}	0.041±0.000 ^{abcd}	+	0
774	0.043±0.002 ^{bc}	0.045±0.005 ^{cdef}	+	+
731	0.044±0.005 ^{bcd}	0.044±0.002 ^{abcde}	+	+
759	0.045±0.002 ^{bcde}	0.043±0.002 ^{abcd}	+	+
732	0.045±0.004 ^{bcde}	0.043±0.000 ^{abcd}	+	+
751	0.044±0.003 ^{bcd}	0.040±0.001 ^{abc}	+	0
ATCC 14028	0.157±0.001 ^g	0.145±0.001 ^h	+++	++
Control negativo	0.035±0.001 ^a	0.039±0.001 ^a	0	0

Los resultados son valores medios y desviación estándar de tres repeticiones. ^{abcdefg} Las medias seguidas de letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Clasificación de cepas: 0= no productora de biopelícula; += débil productora; += moderada productora; +++= fuerte productora.

Este alto porcentaje de cepas con capacidad de formación de biopelículas en TSB obtenido en este estudio, concuerda con el descrito en el estudio realizado por Avila-Novoa y col., (2021), en el cual utilizaron TSB diluido 1/20 y determinaron que el 100% de las cepas de *Salmonella* spp. que aislaron de productos hortofrutícolas presentaron capacidad de formación de biopelícula. Sin embargo los estudios difieren en que en el presente estudio todas las cepas aisladas de aguacate Hass con capacidad de formación de biopelícula fueron clasificadas como débiles productoras, en cambio, la mayoría de las cepas aisladas de productos hortofrutícolas (96%) fueron clasificadas como fuertes productoras. Las discrepancias entre estos estudios pueden fundamentarse en que los patógenos entéricos forman biopelículas cuando están bajo estrés o se cultivaban en medios que carecen de nutrientes esenciales [7]. De hecho, los medios de crecimiento diluidos mejoran la expresión de genes de *Salmonella* spp. que participan en la formación de biopelículas [7,8], además el origen de las cepas puede ser un factor importante que influye sobre la capacidad de formación de biopelículas, también lo es el serotipo, ya que en el estudio de Avila-Novoa y col., (2021) se concluyó que dependiendo del serotipo hay variabilidad en la capacidad de formación de biopelículas [7].

A su vez en esta investigación se detectó que el tipo de cepa, el medio de cultivo y la interacción entre ambos factores influyen en la capacidad de formación de una biopelícula ($p < 0.5$). En el medio TSB además del control positivo las cepas que obtuvieron una densidad óptica (DO_{570}) mayor fueron la 745, 640, 638 y 753, cuyas densidades ópticas fueron 0.049 ± 0.005 ; 0.050 ± 0.012 ; 0.051 ± 0.010 y 0.056 ± 0.014 respectivamente, mientras que en LB además del control positivo, las cepas con mayor densidad óptica fueron la 740, 736, 733 y 763 con un resultado de 0.048 ± 0.009 ; 0.050 ± 0.009 ; 0.051 ± 0.007 y 0.052 ± 0.002 respectivamente (Tabla 1). Además se determinó que el medio que favorece la densidad óptica (DO_{570}) de la biopelícula es el TSB en comparación con LB. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Keelara y col. (2016) en donde determinaron que la capacidad de formación de la biopelícula de *Salmonella* spp. se ve favorecida en el medio TSB en comparación con LB. Esto puede atribuirse a que al contenido de NaCl en LB promueve una interferencia en la expresión de la matriz extracelular adhesiva, dificultado la formación de biopelícula [8]. Además de los factores descritos, otros factores ambientales como la temperatura, el tiempo de incubación, la naturaleza de la superficie de adhesión y la carga microbiana inicial pueden influir en la capacidad de formación de biopelículas [5-8].

Conclusiones

Las cepas de *Salmonella* spp aisladas de aguacate Hass comercializado en mercados minoristas en Guadalajara, México, presentan capacidad de formación de biopelículas. Esto evidencia la importancia del cumplimiento de requisitos previos a lo largo de toda la cadena productiva, como las Buenas Prácticas Agrícolas y las Buenas Prácticas de Higiene en el manejo de productos agrícolas frescos, en particular del aguacate. Además los resultados obtenidos son concluyentes de que el tipo de cepa de *Salmonella* spp, el medio de cultivo donde se generan las biopelículas y las interacciones entre ambos, son factores que influyen en la capacidad de formación de biopelículas, esta información proporciona una pauta importante para la búsqueda y desarrollo de estrategias de control de biopelículas. Sin embargo, se requieren de más estudios que evalúen la capacidad de formación de biopelículas de *Salmonella* spp bajo distintas condiciones de diversos factores extrínsecos, intrínsecos e implícitos, para conocer la influencia de dichos factores y sus interacciones encaminado esto a comprender mejor el sistema complejo de biopelícula y con ello facilitar la búsqueda y desarrollo de estrategias de control de biopelículas.

Referencias

1. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2021). *Salmonella*. [Online] <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>. Consultado: 16 abril 2021.
2. FDA (Food And Drug Administration). (2018). FDA Releases Reports on Avocado and Hot Pepper Sampling. [Online] <https://www.fda.gov/food/cfsan-constituent-updates/fda-releases-reports-avocado-and-hot-pepper-sampling>. Consultado: 16 abril 2021.
3. García, R. Tesis Posgrado. (2018). Perfil microbiano del epicarpio de aguacate (*Persea americana*, variedad Hass) adquirido en mercados locales de Guadalajara, Jalisco, Instituto Politécnico Nacional, México. https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/27140/Tesis_Ram%C3%B3n_Garc%C3%ADa_Frutos.pdf?sequence=1&isAllowed=y
4. FAO (Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2011). Agronoticias: Actualidad agropecuaria de América Latina y el Caribe. [Online] <http://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/508691/>. Consultado: 30 abril 2021.
5. Téllez, S. (12 mayo 2010). Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria. VISAVET [online] <https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>. Consultado: 30 abril 2021.
6. García, R., Martínez, L., Cabrera, E., Gutiérrez, P., Montañez, J. L., Varela, J. J. & Martínez, N. E. (Enero 2020). *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and Indicator Microorganisms on Hass Avocados Sold at Retail Markets in Guadalajara, México. *Journal of Food Protection* [online] Vol. 83, Art. # 1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31851548/>. Consultado: 30 abril 2021.
7. Avila-Novoa, M., Guerrero-Medina, P., Navarrete-Sahagún, V., Velázquez-Suárez, Gómez-Olmos, I., N., De la Cruz-Color, L. & Gutiérrez-Lomelí, M. (16 abril 2021). Applied sciences Biofilm Formation by Multidrug-Resistant Serotypes of *Salmonella* Isolated from Fresh Products : Effects of Nutritional and Environmental Conditions. *MDPI* [online] Vol. 11, Art. # 8. <https://www.mdpi.com/2076-3417/11/8/3581>. Consultado: 11 mayo 2021.
8. Keelara, S., Thakur, S. & Patel, J. (29 junio 2016). Biofilm Formation by Environmental Isolates of *Salmonella* and Their Sensitivity to Natural Antimicrobials. *Foodborne Pathog Dis* [online] Vol. 13, Art. # 9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27356028/>. Consultado: 25 junio 2021.