



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Condiciones ambientales y
expresión génica en cepas de
Salmonella spp.

Alba María Paz Méndez

Grado en Veterinaria

Año 2017

Modalidad del trabajo: Experimental

LICENCIA

Esta obra pertenece a Alba María Paz Méndez, y está sujeta a la licencia Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



RESUMO

O xénero *Salmonella* encontrase mundialmente estendido e representa un problema importante de saúde pública ó ser un dos principais patóxenos que produce enfermidades por consumo de alimentos. A capacidade de este xénero para formar biofilms favorece a súa prevalencia e a súa capacidade de avanzar o longo da cadea alimentaria, dende a granxa a mesa. Diversos estudos observaron que a capacidade de formación de biofilms varía en función da cepa de *Salmonella* avaliada. Polo tanto, o obxectivo deste traballo foi avaliar en once cepas pertencentes a cinco serotipos diferentes de *Salmonella enterica* e unha cepa de *Salmonella enterica* subsp. *salamae* a formación de biofilms en varios medios de cultivo, temperaturas e superficies. Así mesmo, avaliouse o morfotipo e a motilidade das doce cepas de *Salmonella* spp. Tamén relacionouse a expresión xénica e de ARNs coa formación de biofilms de tales cepas. A motilidade nas diferentes temperaturas avaliadas só mostra diferencias significativas entre 22, 30 e 37 °C con 6 °C. En cambio, o morfotipo foi diferente nas catro temperaturas avaliadas e a 22 °C todas as cepas presentaban o morfotipo RDAR (Red, dry and rough), que está intimamente relacionado ca formación de biofilms. O conservante alimentario que máis diminuíu a formación de biofilms e o acetato sódico, inhibindo a formación de biofilms de tódalas cepas en aceiro inoxidable, mentres que cos medios suplementados con nitritos e sulfitos, en ambas superficies se formaron máis o igual cantidade de biofilms que nos residuos alimentarios. Isto relacionouse coa curva de crecemento na cal o acetato sódico retrasaba o comezo da fase exponencial e os nitritos e os sulfitos mostraban maior crecemento cos residuos alimentarios. A expresión xénica variou dependendo da cepa e do medio de cultivo avaliado exceptuando o xene *csgD* que estivo infraexpresado en tódolos casos en comparación co medio de cultivo de referencia 1/20 TSB. Os xenes de virulencia correlacionáronse positivamente cos xenes relacionados coa formación de biofilms, excepto no exsudado de polo no que a correlación foi negativa. Os resultados deste traballo indican ca formación de biofilms e a expresión xénica varían dependendo da cepa, da temperatura, da superficie e do medio de cultivo avaliado. Tamén resalta a falta de eficacia dos conservantes máis comunmente empregados o que pode supoñer un problema de saúde pública. Son necesarios mais estudos avaliando diferentes reguladores da formación de biofilms para obter unha visión máis completa do mecanismo de formación de biofilms na industria alimentaria.

PALABRAS CHAVE: *Salmonella*; Biofilms; Morfotipo; Expresión xénica; ARNs; Residuo alimentario; Conservante alimentario.

RESUMEN

El género *Salmonella* se encuentra extendido mundialmente y representa un problema importante de salud pública al ser uno de los principales patógenos que produce enfermedades por consumo de alimentos. La capacidad de este género para formar biofilms favorece su prevalencia y su capacidad de avanzar a lo largo de la cadena alimentaria, desde la granja al consumidor. Diversos estudios han observado que la capacidad de formación de biofilms varía en función de la cepa de *Salmonella* evaluada y de las condiciones ambientales. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar en once cepas pertenecientes a cinco serotipos diferentes de *Salmonella enterica* y una cepa de *Salmonella enterica* subsp. *salamae* la formación de biofilms en varios medios de cultivo, temperaturas y superficies. Así mismo, se evaluó el morfotipo y la motilidad de las doce cepas de *Salmonella* spp. También se relacionó la expresión génica y de ARNs con la formación de biofilms de dichas cepas. La motilidad en las diferentes temperaturas evaluadas solo muestra diferencias significativas entre 22, 30 y 37 °C con 6°C. En cambio, el morfotipo fue diferente en las cuatro temperaturas evaluadas y a 22 °C todas las cepas presentaban el morfotipo RDAR (Red, dry and rough), que está íntimamente relacionado con la formación de biofilms. El conservante alimentario que más disminuyó la formación de biofilms fue el acetato sódico, inhibiendo la formación de biofilms de todas las cepas en acero inoxidable mientras que, en los medios suplementados con nitritos y sulfitos, en ambas superficies se formaron más o igual cantidad de biofilms que en los residuos alimentarios. Esto se relacionó con la curva de crecimiento en la cual el acetato sódico retrasaba el comienzo de la fase exponencial y los nitritos y los sulfitos mostraban mayor crecimiento que los residuos alimentarios. La expresión génica varió dependiendo de la cepa y del medio de cultivo evaluado exceptuando el gen *csgD* que estuvo infraexpresado en todos los casos en comparación con el medio de cultivo de referencia 1/20 TSB. Los genes de virulencia se correlacionaron positivamente con los genes relacionados con la formación de biofilms, excepto en el exudado de pollo en el que la correlación era negativa. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la formación de biofilms y la expresión génica variaron dependiendo de la cepa, la temperatura, la superficie y el medio de cultivo evaluado. También resalta la falta de eficacia de los conservantes más comúnmente utilizados lo que puede suponer un problema de salud pública. Son necesarios más estudios evaluando diferentes reguladores de la formación de biofilms para obtener una visión más completa del mecanismo de formación de biofilms en la industria alimentaria.

PALABRAS CLAVE: *Salmonella*; Biofilms; Morfotipo; Expresión génica; ARNs; Residuo alimentario; Conservante alimentario.

ABSTRACT

Salmonella spp. is a worldwide food-borne pathogen and represents a major concern in public health. The capacity of this microorganism to produce biofilms favors its prevalence and the ability to progress through the food chain, from the farm to the consumer. Many studies have observed that the capacity of *Salmonella* to form biofilms varies depending on the strain and the environmental conditions. Thus, the aim of this study was to evaluate the biofilm formation ability in different growth mediums, temperatures and surfaces of eleven different strains from five distinct *Salmonella enterica* serotypes and one strain from *Salmonella enterica* subsp. *salamae*. Furthermore, morphotype and motility of the twelve strains was evaluated. Gene and sRNA expression was also evaluated in relation with biofilm formation. Motility of the twelve strains only showed significant differences between 6 °C and 22, 30 and 37 °C. However, morphotype varied according with the temperature evaluated and all the strains showed the RDAR (Red, dry and rough) morphotype at 22 °C which is closely related with biofilm formation. Within the food preservatives, sodium acetate inhibited biofilm formation in stainless steel where none of the strains formed biofilm. Growth media supplemented with nitrites and sulfites caused higher biofilm formation than food residues. These results were related with those results found in the growths curves. *Salmonella* strains growth in sodium acetate began the exponential phase later than the other food preservatives evaluated. Also, nitrites and sulfites showed more growth than food residues. Gene expression varied depending on the strain and the growth media except in the case of *csgD* that was down-expressed in each growth medium tested in comparison with the reference media 1/20 TSB. Virulence genes showed a positive correlation with biofilm related genes except in chicken juice in which the correlation was negative. The results obtained in this study showed that biofilm formation and gene expression is strain, temperature, surface and growth media dependent. Also, this study highlights the lack of effectiveness of commonly used food preservatives that may represent a public health problem. More studies evaluating different biofilm major regulators are necessary for gaining a fuller picture of biofilm formation mechanism in food industry.

KEYWORDS: *Salmonella*; Biofilms; Morphotype; Gene expression; sRNA; Food residue; Food preservative.

ÍNDICE

Resumo.....	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
1. Introducción.....	7
1.1. <i>Salmonella</i> spp.....	7
1.2. Los biofilms.....	9
1.3. Conservantes de uso alimentario.....	11
1.4. Influencia de residuos alimentarios en la formación de biofilms.....	12
1.5. Expresión génica.....	13
2. Objetivos.....	15
3. Materiales y métodos.....	16
3.1. Cepas bacterianas.....	16
3.2. Cuantificación de los biofilms formados.....	16
3.2.1. Obtención exudado de pollo.....	17
3.2.2. Cuantificación de biofilms en microplacas de poliestireno.....	17
3.2.3. Cuantificación de biofilms en placas de acero inoxidable.....	18
3.3. Morfología de la colonia y producción de celulosa.....	19
3.4. Test de motilidad.....	19
3.5. Expresión de los genes relacionados con los biofilms y el <i>quorum sensing</i>	19
3.6. Curvas de crecimiento.....	21
3.7. Análisis estadísticos.....	21
4. Resultados y discusión.....	22
4.1. Morfología de la colonia, producción de celulosa y motilidad.....	22
4.2. Cuantificación de los biofilms formados.....	24
4.2.1. Cuantificación de biofilms en microplacas de poliestireno.....	24
4.2.2. Cuantificación de biofilms en placas de acero inoxidable.....	30
4.3. Expresión de los genes relacionados con los biofilms y el <i>quorum sensing</i>	33
4.4. Curvas de crecimiento.....	41
5. Conclusiones.....	42
6. Bibliografía.....	44
7. Abreviaturas.....	50

1.INTRODUCCIÓN

1.1. *SALMONELLA* SPP.

El género *Salmonella* spp. se encuentra extendido mundialmente y representa un importante problema de salud pública ya que es uno de los principales patógenos que produce enfermedades por consumo de los alimentos. Está constituido por bacilos Gram negativos, no formadores de esporas, no capsulados, anaerobios facultativos y clasificados dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Imen, Ridha & Mahjoub 2012). Las condiciones óptimas de crecimiento para este género son 35-40 °C, con un rango de pH de 6,5-7,5 (Li 2016). Este género se divide en dos especies: *S. enterica*, la cual incluye 6 subespecies, y *S. bongori*. Cada una de estas subespecies tiene asignado un símbolo y, mediante pruebas bioquímicas específicas, se pueden diferenciar entre ellas, tal y como se aprecia en la Tabla 1.

Solo reciben nombre propio los serotipos pertenecientes a la subespecie *enterica*, ya que suponen más del 99,5% de las cepas de *Salmonella* que se aíslan. Los serotipos pertenecientes al resto de las subespecies se designan únicamente con su fórmula antigénica según el esquema de Kauffmann-White (Grimont, Weill 2007), que se basa en el antígeno somático, el antígeno flagelar de fase 1 y el antígeno flagelar de fase 2, dando lugar a una expresión del tipo: O:H:H2.

Tabla 1 Clasificación del Género *Salmonella* y diferenciación de subespecies según sean positivas (+) o negativas (-) a determinadas pruebas bioquímicas. Cuando algunas cepas de las subespecies, unas veces dan positivo y otras dan negativo se expresa con +/-

Especie	Subespecie	Símbolo	Dulcitol	Gelatinasa	Lactosa
<i>S. enterica</i>					
	<i>enterica</i>	I	+	-	-
	<i>salamae</i>	II	+	+	-
	<i>arizonae</i>	IIIa	-	+	-
	<i>diarizonae</i>	IIIb	-	+	+
	<i>houtenae</i>	IV	-	+	-
	<i>indica</i>	VI	+/-	+	+/-
<i>S. bongori</i>			+	-	-

En cuanto a las manifestaciones clínicas de la infección por *Salmonella*, la gastroenteritis suele ser autolimitante, pudiendo resolverse la fiebre entre las 48 y 72 horas y la diarrea entre

los 3 y 7 días. Las complicaciones pueden incluir deshidratación severa, shock, colapso y/o septicemia. Los síntomas suelen ser más severos en niños, personas mayores e inmunocomprometidos (Cummings, Sorvillo & Kuo 2012). La mayoría de las salmonellas aisladas en humanos son serotipos pertenecientes a la subsp. *enterica*. Los serovares Typhi y Paratyphi A de la subsp. *enterica*, son los agentes etiológicos causantes de las fiebres tifoideas y paratifoideas. Estos serovares suelen ser más comunes en países en vías de desarrollo como son América del sur, África y partes de Asia, siendo un problema importante de salud pública (Sharma *et al.* 2016). En países desarrollados en los que hay una vigilancia activa y coordinada de las enfermedades alimentarias, los principales serovares causantes de salmonelosis son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (EFSA-ECDC 2016).

Según el informe anual publicado por la EFSA-ECDC en 2016 (datos de 2015), a pesar de que los brotes de zoonosis de origen alimentario por *Salmonella* descendieron en el periodo desde 2008 hasta 2014, en el 2015 ha habido un aumento de los casos (1,9%). En 2015 se notificaron un total de 96.144 casos de salmonelosis en la Unión Europea y 9.047 de ellos se notificaron en España, siendo los serovares identificados como más frecuentes *Salmonella* Enteritidis (45,7%) y *S. Typhimurium* (15,8%). En España, debido a una mejora en el sistema de vigilancia de la presencia de salmonelosis, hubo un aumento del 36,5% de casos confirmados (EFSA-ECDC 2016).

Las fuentes de *Salmonella* en la cadena alimentaria son diversas, pero sin lugar a dudas los productos de origen avícola son los principales responsables de la transmisión de *Salmonella* destacando tanto los ovoproductos como la carne de pollo (EFSA-ECDC 2016). En 2014 en España, el alimento implicado con más frecuencia en casos de toxiinfecciones alimentarias fue el huevo y sus derivados (68,8% de los brotes con identificación del alimento) seguido, aunque en menor medida, de la carne de pavo, cerdo y ternera y esporádicamente los productos de origen vegetal también pueden ser responsables de casos de salmonelosis en el ser humano (EFSA-ECDC 2016).

Dada la trascendencia de los productos de origen animal en la transmisión de salmonelosis, el Reglamento (CE) N.º 2160/2003 (Comisión Europea 2003) establece la importancia de llevar a cabo en los países miembros planes de control de *Salmonella* que reduzcan la presencia de este patógeno en el primer paso de la cadena alimentaria: las granjas. Como se ha comentado anteriormente, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son los principales serotipos responsables de infecciones en el ser humano. Teniendo en cuenta estos datos y con el objetivo de reducir el número de infecciones por estos serotipos en el ser humano, el Reglamento (CE) N.º 200/2012 (Comisión Europea 2012) establece la necesidad de controlar la presencia de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* en las granjas de pollos de engorde. El fin

último de esta legislación es no superar una prevalencia en granja superior al 1%, sumando los dos serotipos. Sin embargo, la capacidad de determinadas cepas de *Salmonella* spp. para formar biofilms también es un factor que puede afectar tanto a la prevalencia de este patógeno como a su capacidad de avanzar en la cadena alimentaria contaminando mataderos, salas de despiece, otras fases del procesado de alimentos y llegando finalmente al último punto de la cadena alimentaria: el consumidor.

1.2. LOS BIOFILMS

Los biofilms fueron descritos por primera vez por Antonie van Leeuwenhoek en el siglo XVII cuando examinaba la placa de sus propios dientes, pero hasta 1978 no se promulgó la teoría general de los biofilms (Rodney, Costerton 2002). Los biofilms se definen como comunidades de células bacterianas estructuradas, encapsuladas en una matriz polimérica auto-producida que se pueden adherir de manera irreversible a superficies inertes o vivas, o entre ellas mismas (Steenackers *et al.* 2012). Las células inicialmente se unen a superficies bióticas o abióticas de forma reversible mediante interacciones como pueden ser fuerzas electrostáticas débiles, interacciones hidrofóbicas o fuerzas de Van der Waal's. Esto ocurre rápido, pero en un intervalo de tiempo relativamente corto sucede la modificación de la expresión génica y comienza el crecimiento del biofilm, con una unión irreversible de las células mediante estructuras de unión hidrofóbica como fimbrias, flagelos, proteínas adhesivas y/o lipopolisacáridos (Phillips 2016). La formación y distribución del biofilm son procesos altamente controlados y regulados a nivel genético y por señales ambientales. Los conocimientos actuales señalan al *quorum sensing* (QS) (que se explicará ampliamente más adelante) y cadenas cortas de ARN (ARNs) como los principales reguladores de los biofilms bacterianos (Figura 1), por lo menos en gran parte de las especies Gram negativas (Wolska *et al.* 2016).

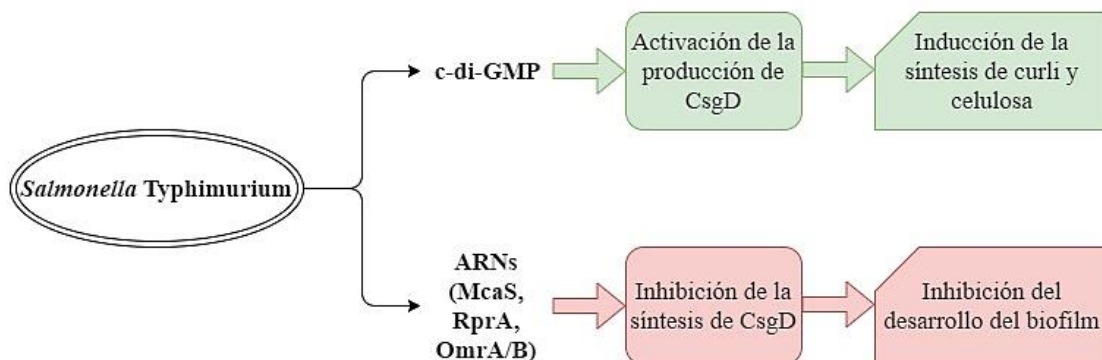


Figura 1 Esquema de la regulación de la formación de biofilm de *S. Typhimurium* por parte de c-di-GMP y ARNs. (Wolska *et al.* 2016). Las fimbrias curli se explicarán más adelante.

Las bacterias que se encuentran en los biofilms generalmente están bien protegidas frente al estrés ambiental y desinfectantes y, como consecuencia, es extremadamente difícil su erradicación. Por esto en la industria alimentaria pueden crear una fuente de contaminación

constante, conduciendo a serios problemas higiénicos y pérdidas económicas a consecuencia del deterioro continuo de los alimentos producidos (Gómez-Aldapa *et al.* 2012). Además, la mayor prioridad es la seguridad alimentaria, puesto que la globalización del transporte y un creciente auge del consumo de alimentos crudos, frescos y mínimamente procesados pueden hacer que un solo lote de alimentos contaminados dé lugar a brotes alimentarios en diversos puntos geográficos. En gran cantidad de artículos científicos se ha demostrado la habilidad de las cepas de *Salmonella* spp. para formar biofilms en superficies abióticas como el plástico (Stepanović *et al.* 2004, Lamas *et al.* 2016a, Hurrell *et al.* 2009), la goma (Arnold, Yates 2009), el cemento (Joseph *et al.* 2001), el cristal (Solano *et al.* 2001) y el acero inoxidable (Joseph *et al.* 2001), superficies que fácilmente están presentes en granjas, mataderos, industrias procesadoras de alimentos, cocinas...

La capacidad para producir celulosa y/o fimbrias curli en el medio de cultivo agar con Rojo Congo, es responsable de los diferentes morfotipos que presenta *S. enterica* (Steenackers *et al.* 2012). Las fimbrias curli son proteínas de superficie altamente agregativas y no ramificadas que en los biofilms promueven las interacciones célula-célula y célula-superficie (Steenackers *et al.* 2012). El morfotipo RDAR (Red, dry and rough), que se caracteriza por la producción de celulosa y fimbrias curli, ha sido muy estudiado en *S. enterica* debido a que le permite persistir en un amplio rango de condiciones ambientales (Chia *et al.* 2011). Además, se ha observado que las células que muestran este morfotipo se relacionan con la formación de biofilms en superficies abióticas. Este morfotipo está estrechamente ligado a los genes *csgD* y *adrA*, que son responsables de la regulación de la producción de celulosa (Steenackers *et al.* 2012). El gen *csgD* es considerado una de las unidades principales de control y regulación en la expresión de componentes de la matriz de los biofilms de *Salmonella* spp. (Steenackers *et al.* 2012). En 2005, Ledebøer y Jones comprobaron mediante un experimento en el que utilizaban cepas de *S. Typhimurium* defectivas en un gen productor de celulosa (*yhjN*), que la celulosa es crucial para la maduración del biofilm (Ledebøer, Jones 2005). Por tanto, se considera muy importante determinar el morfotipo presente ya que juega un papel crucial en la posible formación de biofilms (Tabla 2). Otros genes como *hilA* o *invA*, que están relacionados con la invasión de células eucariotas por parte de *Salmonella* spp, pueden influir también en la formación de biofilms. En la actualidad no hay muchos estudios que relacionen cómo afecta la expresión de *hilA* e *invA* a la formación de biofilms (Aviles *et al.* 2013).

Otro factor relacionado con la formación del biofilm es el *quorum sensing* (QS) o comunicación bacteriana célula-célula (Bai, Rai 2011). Este fenómeno se define como el mecanismo bacteriano de comunicación intercelular, que permite a las bacterias modificar el comportamiento, de manera colectiva, en respuesta a cambios en la densidad celular y las

especies que componen la comunidad celular adyacente (Papenfort, Bassler 2016). La regulación de la expresión génica de las bacterias por QS es causada por pequeñas moléculas llamadas autoinductores, y resulta en cambios fenotípicos que permiten a la bacteria adaptarse eficientemente a las condiciones ambientales durante el crecimiento de la comunidad bacteriana. Así, los genes autoinductores como *sdiA* y *luxS*, juegan un papel importante en la producción de biofilms “sanos” y completamente desarrollados. Un biofilm “sano” es aquel en el que las bacterias viven en un entorno protegido, con una densidad de población regulada y una actividad metabólica que le permita optimizar al máximo los nutrientes disponibles (Bai, Rai 2011).

Tabla 2 Distintos morfotipos que puede presentar *Salmonella* spp. dependiendo de las sustancias producidas.

Morfotipo	Sigla	Producción	No producción
Red, dry and rough	RDAR	Celulosa y fimbrias curli	
Brown, dry and rough	BDAR	Fimbrias curli	Celulosa
Pink, dry and rough	PDAR	Celulosa	Fimbrias curli
Smooth and White	SAW		Celulosa y fimbrias curli
Smooth, Brown and mucoid	SBAM	Polisacárido capsular	Celulosa y fimbrias curli

1.3. CONSERVANTES DE USO ALIMENTARIO.

La adición de conservantes antimicrobianos aumenta la vida útil de los productos alimentarios, pero incluso cuando los productos están suplementados con una cantidad adecuada de conservantes, no siempre es posible inhibir los microorganismos en un biofilm (Er *et al.* 2014). Algunos alimentos por sí mismos constituyen medios de cultivo excelentes para muchos patógenos, por ello a alimentos como la carne se le añaden conservantes, entre los que destacan por su amplio uso los sulfitos y nitritos (Müller-Herbst *et al.* 2016). El nitrito sódico (NaNO_2) es muy utilizado en la industria cárnica ya que resulta ser bastante efectivo en estos productos por tener actividad para destruir la membrana celular o la estructura proteica y enzimática de los microorganismos, además está involucrado en la formación del color y sabor típicos del curado (Er *et al.* 2014). Los grandes inconvenientes del uso de nitritos es, que al tratarse de aditivos alimentarios, son etiquetados como tal (E 249-250) y no son aceptados por determinados grupos de consumidores y además son tóxicos en altas concentraciones y pueden formar nitrosaminas carcinogénicas cuando se calientan o se exponen a condiciones ácidas, por ejemplo, en el estómago (Müller-Herbst *et al.* 2016). Otro conservante ampliamente usado en este sector son los sulfitos. Estos se usan para conservar productos cárnicos frescos debido a su capacidad antimicrobiana y antioxidante. Así mismo, son empleados como estabilizantes del color. No obstante, la exposición a SO_2 puede producir

reacciones alérgicas y respiratorias en personas sensibles, entre otros problemas de salud (Serrano, Bañón 2012). Teniendo en cuenta que usados en muy grandes cantidades estos conservantes pueden afectar a la salud humana, en el Reglamento (UE) N.º 1129/2011 (Comisión Europea 2011) se establecen los límites legales de su presencia en los alimentos. Dados los inconvenientes de los conservantes mencionados anteriormente, en la actualidad se están buscando productos alternativos como el acetato sódico, que sean igual de eficaces, pero sin los efectos secundarios de los conservantes tradicionales.

La tecnología “Hurdle” o tecnología de obstáculos, se basa en poner ciertos “obstáculos” para que las bacterias no se multipliquen. Así se usa por ejemplo microbiota competitiva, acidificar el alimento, disminuir su actividad de agua (con azúcar o sal) y/o disminuir su potencial redox (con ascorbato o conservantes como el NaNO_2) (Müller-Herbst *et al.* 2016). En el estudio llevado a cabo por Mühlig y colaboradores (2014) expusieron a *Salmonella* Typhimurium a 150 mg/l de NaNO_2 acidificado con ácido láctico a 24 °C y pudieron comprobar que los genes involucrados en la protección frente al estrés nitrosativo estaban sobre-expresados, y los relacionados con procesos como transducción, traducción, replicación y motilidad estaban infra-expresados. Esto implica que hubo una acidificación intracelular y que se vieron comprometidos procesos fisiológicos cruciales (Mühlig *et al.* 2014). Cuando Müller-Herbst y colaboradores (2016) realizaron un experimento similar con *Listeria monocytogenes*, pero comparando el crecimiento de esta bacteria a diferentes valores de pH encontraron que a menor pH del medio más efecto tenía el NaNO_2 y menor crecimiento bacteriano se apreciaba (Müller-Herbst *et al.* 2016).

1.4. INFLUENCIA DE RESIDUOS ALIMENTARIOS EN LA FORMACIÓN DE BIOFILMS

En las industrias alimentarias se generan gran cantidad de residuos de alimentos sobre superficies durante procesado. Cuando estas superficies no son limpiadas a tiempo o se limpian pero de manera insuficiente, las bacterias forman los biofilms sobre las superficies de la industria alimentaria aprovechando estos residuos alimentarios como fuente de nutrientes. La formación de biofilms por parte de *Salmonella* spp. ha sido ampliamente estudiada en condiciones de laboratorio con medios desarrollados específicamente para su crecimiento. Sin embargo, estas condiciones no se corresponden necesariamente con las que se encuentra la bacteria en las industrias alimentarias. Actualmente no hay gran cantidad de estudios sobre el comportamiento de *Salmonella* spp. en estos entornos, lo que aumenta la importancia de realizar un estudio relacionando la formación de biofilms y condiciones ambientales que se puedan trasponer a industrias alimentarias. Kuda y colaboradores, en 2005 realizaron un estudio para comprobar el efecto de la presencia de residuos de leche (entre otros) sobre el

crecimiento de superficie de *Salmonella* Typhimurium. Una cantidad de 100 nL de leche era capaz de tener efecto protector sobre las bacterias adheridas a las superficies, favoreciendo su resistencia a la desecación, a procesos de eliminación y favoreciendo contaminaciones cruzadas hacia alimentos no contaminados (Kuda *et al.* 2015). En el estudio de Li y colaboradores en 2017, utilizando el exudado obtenido de descongelar carne cruda de pollo y cerdo comprobaron que estos “zumos de carne” son promotores del crecimiento de biofilms de *Salmonella* spp., ya que esta aprovecha sus nutrientes, los residuos de moléculas de QS y forman una capa de revestimiento y protección (Li *et al.* 2017).

1.5. EXPRESIÓN GÉNICA

El transcriptoma puede ser descrito como la población completa de ARN de una célula, la cual puede variar bajo diferentes condiciones ambientales (Puttamreddy *et al.* 2008). La parte más convencional de la transcriptómica es el estudio del ARN mensajero (ARNm), que es el paso intermedio entre los genes y las proteínas. El estudio de la expresión génica es de gran interés en las ciencias de la vida. En concreto en microbiología de los alimentos resulta de gran utilidad, por ejemplo, para conocer cómo los patógenos de origen alimentario activan su maquinaria genética para adaptarse a las distintas condiciones que se encuentran en la industria alimentaria. Conocer cómo afectan las condiciones ambientales a los genes relacionados con la formación de biofilms descritos anteriormente se considera esencial para diseñar nuevas estrategias de eliminación de biofilms en la industria alimentaria.

Otra parte importante de la transcriptómica son los ARNs. El término de ARNs se utiliza para designar ARN no codificador de proteínas (npcARN), que son de origen bacteriano y cortos (de 50 a 400 pb), los cuales son reguladores claves a nivel post-transcripcional y que participan en circuitos complejos adaptando el metabolismo de la bacteria en respuesta a cambios ambientales rápidos (Tabla 3) (Vogel 2009). Esta regulación se lleva a cabo de dos formas diferentes: mediante su unión a ARNm o mediante su unión a proteínas (Ghaz-Jahanian *et al.* 2013). Estos ARNs han sido descubiertos recientemente lo que ha dado lugar a que un amplio número de estudios intenten descifrar de forma clara el papel que juega este tipo de ARN en el metabolismo bacteriano. Hay que señalar, que hasta ahora este conocimiento está casi totalmente centrado en el caso de *Salmonella* spp., en concreto en el serotipo Typhimurium y enfocado a descifrar los mecanismos de su virulencia. En cambio, el papel de estos ARNs en la capacidad de *Salmonella* spp. para persistir en la cadena alimentaria apenas ha sido estudiado. Por tanto, conocer el papel que juegan estos post-reguladores (como los descritos en la Tabla 3) en la formación y maduración del biofilm en la industria alimentaria, puede ser de vital importancia para desarrollar nuevas estrategias de control.

Estos ARNs dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentran las bacterias (pH, nutrientes, temperatura...) actúan sobre diferentes ARNm o proteínas diana. Al actuar sobre sus dianas pueden favorecer la formación de productos de la matriz extracelular de los biofilms favoreciendo así su formación (Ghaz-Jahanian *et al.* 2013). Los flagelos son esenciales para la motilidad, pero también contribuyen a la unión inicial de biofilms a las superficies y por eso cuando estos ARNs reprimen la expresión de los flagelos, pueden tener efecto antibiofilm (Mika, Hengge 2013).

Tabla 3 Tipos de ARNs con sus funciones en diferentes condiciones ambientales (Mika, Hengge 2013, Ghaz-Jahanian *et al.* 2013, Fuentes *et al.* 2015).

ARNs	ARNm/ proteína sobre la que actúa	Condiciones ambientales en las que se expresa	Actividad
ArcZ	CsgD, RpoS FlhDC	Medio de cultivo agotado	Estimula indirectamente la formación de biofilms inhibiendo la expresión de los flagelos.
DsrA	FlhDC CsgD, RpoS	Baja temperatura (25°C)	Favorece de manera indirecta la expresión del regulador de la formación flagelar (FlhDC) y de CsgD.
OxyS	FlhDC RpoS	Estrés oxidativo	Inducido por estrés por peróxido de hidrogeno, inhibe la expresión de FlhDC e indirectamente la de CsgD.
RprA	RpoS, CsgD FlhDC	Perturbación de la membrana celular	Regula negativamente la expresión del regulador de la formación flagelar y la síntesis de ácido colánico. También regula directamente a CsgD disminuyendo su expresión.
SroC	<i>flhBAE</i> <i>fliE</i>	Medio de cultivo agotado. Condiciones desfavorables	Participa en la regulación negativa de la motilidad bacteriana promoviendo el cambio de células planctónica a biofilms.
CsrB	CsrA, CsrD	Medio de cultivo agotado. pH desfavorable	Activa el proceso de formación de biofilms secuestrando al regulador de la síntesis de flagelos y represor de la formación de biofilms

2.OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Evaluar la capacidad de producir biofilms de cepas de *Salmonella* spp. en condiciones similares a las encontradas en la industria alimentaria, en concreto en distintas condiciones de temperatura (6, 22, 30 y 37°C) y distintas superficies (poliestireno y acero inoxidable).
2. Determinación de la influencia del morfotipo y motilidad de *Salmonella* spp. en la formación de biofilms a diferentes temperaturas.
3. Evaluar la influencia de las condiciones ambientales encontradas en la industria alimentaria sobre la expresión génica de *Salmonella* spp., más concretamente sobre genes relacionados con la formación de biofilms y sus post-reguladores, ARNs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS

En total se utilizaron doce cepas bacterianas (Tabla 4) que fueron aisladas de muestras procedentes de granjas de pollos en Galicia o de carne de pollo. Todas las cepas de *Salmonella* utilizadas fueron serotipadas utilizando el método esquemático Kauffman-Whyte de aglutinación para la detección de antígenos somáticos y flagelares, mediante antisuero estándar (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Once de las cepas pertenecían a la subespecie *enterica*, mientras que la otra cepa pertenecía a *Salmonella enterica* subespecie *salamae*.

Tabla 4 Cepas de *Salmonella* spp. utilizadas en este estudio y su origen. Si se trata de un serotipo de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, el nombre aparecerá en mayúsculas mientras que, si se trata de una subespecie de *Salmonella enterica*, estará en cursiva y minúsculas.

Código	Serotipo/subespecie <i>Salmonella</i>	Origen
B2	Bardo	Gallinero
ET1	Enteritidis	Pollo
I4	Infantis	Gallinero
I5	Infantis	Gallinero
N2	Newport	Gallinero
N3	Newport	Gallinero
N5	Newport	Gallinero
T1	Typhimurium	Pollo
T4	Typhimurium	Gallinero
T5	Typhimurium	Gallinero
T6	Typhimurium	Gallinero
AZ16	<i>salamae</i>	Gallinero

3.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS BIOFILMS FORMADOS

La habilidad de las cepas para producir biofilms fue medida mediante el método de Stepanović y colaboradores (2004) con algunas modificaciones. Las cepas se incubaron a cuatro temperaturas diferentes (6, 22, 30 y 37 °C) y en seis medios de cultivo diferentes, uno con *Tryptic soy broth* (TSB; Oxoid Ltd., Hampshire, UK) diluido (1/20 TSB), otros tres con componentes adicionales a la disolución 1/20 de TSB: (I) 200 mg/l de nitritos, (II) 450 mg/l de sulfitos y (III) acetato sódico al 1%, otro con una disolución 1/20 de leche entera y un último medio de cultivo compuesto por exudado de pollo. Una vez autoclavados los diferentes medios, se midió el pH utilizando un pHímetro GLP 22 (Crison, Barcelona, España).

3.2.1. OBTENCIÓN EXUDADO DE POLLO

Para la obtención del exudado de pollo, se compraron pollos refrigerados de un supermercado local. A continuación se congelaron 24 horas (-20°C) y se descongelaron durante otras 24 horas (4°C). Se recogió el líquido obtenido y se centrifugó a 12.000 ×g durante 10 min empleando una microcentrífuga (5415 D, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Mediante filtros de jeringa estériles Millex® - HV (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda) de 0,45 µm de poro, se esterilizó el sobrenadante.

3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE BIOFILMS EN MICROPLACAS DE POLIESTIRENO

Se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos cada una (Deltalab, España). Las placas fueron llenadas con 200 µl de medio de cultivo. A continuación, se le añadieron 20 µl de un cultivo de *Salmonella* spp. (Figura 2) incubado en TSB durante toda la noche (contenía aproximadamente 10⁸ UFC/ml). Las placas se incubaron aeróbicamente a 37 (5), 30 (6) y 22 °C (6) durante 48 horas. Las demás placas se incubaron a 6 °C (6) durante siete días. Cada cepa fue testada ocho veces en cada medio de cultivo. Por falta de disponibilidad de exudado de pollo no se testaron las cepas a 37°C.

Después de la incubación los pocillos se vaciaron y se lavaron tres veces con 200 µl de agua destilada. Las bacterias unidas a las paredes de los pocillos se fijaron con 200 µl de metanol durante 15 minutos. A continuación, se vaciaron las placas y se secaron al aire y posteriormente se tiñeron con 250 µl de cristal violeta al 0,1% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) durante 5 minutos. El exceso de cristal violeta se eliminó poniendo las placas bajo una corriente de agua. Las microplacas se dejaron secar al aire y el cristal violeta unido a las células adheridas se solubilizó con 200 µl de ácido acético glacial al 33%, que se le adicionó a cada pocillo. La densidad óptica (OD) de cada pocillo se midió a 630 nm con un lector de placas (DAS, Roma, Italia).

La OD fue utilizada para clasificar las cepas. La OD umbral (OD_c) fue definida como tres desviaciones estándar por encima de la OD media de los controles negativos. Así, las cepas fueron clasificadas según su capacidad para producir biofilms, no productor (OD ≤ OD_c), productor débil (OD_c < OD ≤ [2 × OD_c]), productor moderado ([2 × OD_c] < OD ≤ [4 × OD_c]) o productor fuerte ([4 × OD_c] < OD).

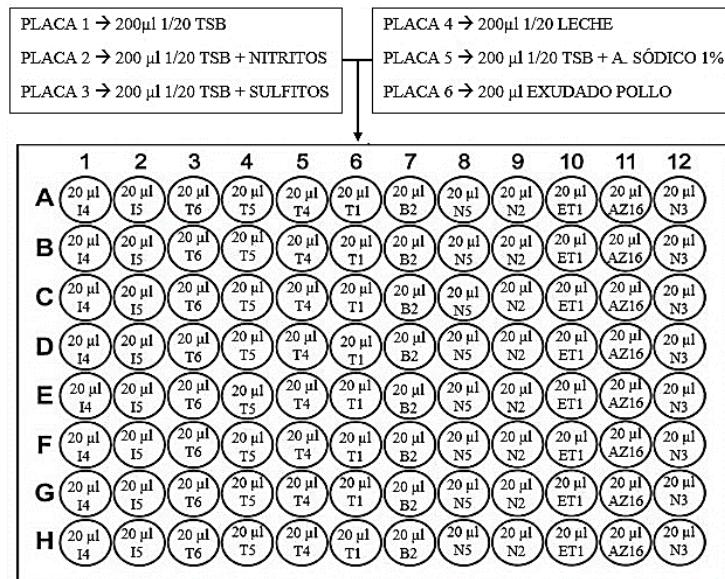


Figura 2 Esquema de inoculado en microplacas de poliestireno junto con el medio que se le añade, dependiendo de que placa se trata, y las cepas que se encuentran en cada columna.

3.2.3. CUANTIFICACIÓN DE BIOFILMS EN PLACAS DE ACERO INOXIDABLE

Se pusieron unas placas de acero inoxidable de 4,5 × 4,5 cm con 10 ml de los medios de cultivo del apartado 3.2 y 100 µl de 10 cepas de la Tabla 4 (N5, T6, ET1, B2, I5, I4, AZ16, T1, T4 y T5) en envases de plástico estériles de 120 ml. Se dejaron incubar durante 48 horas a 22°C y posteriormente se lavaron en agua destilada. Se fijaron durante 15 minutos en una cubeta de plástico con metanol y luego se tiñeron las células del biofilm con cristal violeta durante 5 minutos. Después de lavarlas con una corriente de agua se colocaron en placas Petri para solubilizar el biofilm de las placas con 10 ml de ácido acético glacial al 33%. Se recogieron con una pipeta multicanal, 8 muestras de 200 µl de cada biofilm y se depositaron en una microplaca de plástico de 96 pocillos (Figura 3). La densidad óptica se midió y se clasificó como en el apartado 3.2.2.

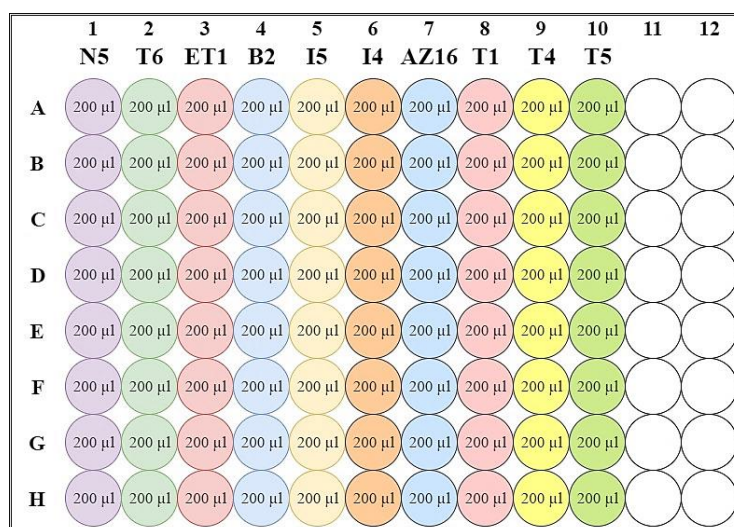


Figura 3 Esquema de la microplaca sembrada con los biofilms de *Salmonella* en metal y solubilizados con ácido acético glacial.

3.3. MORFOLOGÍA DE LA COLONIA Y PRODUCCIÓN DE CELULOSA

Las cepas de *Salmonella* cultivadas toda la noche en TSB fueron sembradas en el medio agar Luria-Bertani (LB) sin sal, suplementado con 40 mg/l de Rojo Congo (Sigma-Aldrich Chemie) y 20 mg/l de Azul brillante Coomassie (Sigma-Aldrich Chemie). La producción de celulosa también se determinó en LB suplementado con 200 mg/l de calcoflúor (Sigma-Aldrich Chemie). La morfología de la colonia y la producción de celulosa se determinó a las 72 horas de incubación en tres de las temperaturas (22, 30 y 37 °C) y la otra temperatura (6 °C) a las 216 horas. Para la detección de celulosa la fluorescencia de la colonia fue evaluada visualmente bajo luz UV a 366 nm.

3.4. TEST DE MOTILIDAD

El test se realizó siguiendo el método utilizado por Karatzas y colaboradores (2008). La motilidad de cada cepa fue evaluada utilizando un medio de cultivo semisólido de prueba de motilidad que consistía en 10 g/l de triptona (Oxoid Ltd.), 5 g/l de NaCl (Merck, Darmstadt, Alemania), 4 g/l de agar (Oxoid Ltd.), 3 g/l de extracto de carne (Oxoid Ltd.), y 0,05 g/l de coluro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (Sigma-Aldrich Chemie). Después de la esterilización (15 min a 121°C) el medio se vertió en placas de Petri estériles. Los cultivos de *Salmonella* incubados toda la noche en el medio de cultivo TSB, se inocularon mediante un toque punzante con un asa de siembra en el medio de cultivo semisólido anteriormente descrito. El metabolismo bacteriano reduce el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio a formazan, que es rosa, permitiendo medir la distancia que las células avanzan a través del medio semisólido desde el punto de inoculación inicial. Se hicieron las mediciones a las 72 y 96 horas para tres temperaturas (22, 30 y 37 °C) y la otra temperatura (6 °C) a las 216 horas.

3.5. EXPRESIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON LOS BIOFILMS Y EL *QUORUM SENSING*.

El ARN total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la cuantificación del ARN se utilizó el kit Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante, junto con el cuantificador fluorimétrico Qubit™ (Thermo Fisher Scientific).

El ARN fue transcrito inversamente a ADNc utilizando el kit de transcripción inversa a ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los ensayos de PCR (10 µl) que contenían 5 µl de 2× SYBR Green (Applied Biosystems), 0,4 µl de cada primer (Tabla 5 y Tabla 6) (10 mM), 1 µl de ADNc y 3,2 µl agua libre de RNasa fueron amplificados utilizando el sistema de PCR en tiempo real

QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems). Las condiciones del termociclador son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 20 s, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 s, alineamiento a 60°C durante 20 s y una curva de derretimiento de 15 s a 95°C, 60 s a 60°C seguido de un paso de disociación durante 15 s a 95°C. Los niveles de ARNm de los genes objetivo fueron normalizados a los niveles de ARN del gen de referencia para 16S ARNr, usando como control interno porque se expresa de manera constitutiva en diferentes condiciones ambientales.

Los niveles de expresión de los genes objetivo en comparación con el control interno de 16s ARNr se evaluaron con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak y Schmittgen (2001), en el cual:

$$\Delta\Delta Ct = (C_{t \text{ gen objetivo}} - C_{t \text{ 16S rRNA}})_{\text{tratamiento}} - (C_{t \text{ gen objetivo}} - C_{t \text{ 16S rRNA}})_{\text{control}}$$

Se realizaron 3 replicados para determinar el cambio de expresión relativo. Los valores de cada gen/ARNs diana en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mayores a 2 se utilizaron como estándar de cambio de expresión génica relativa alta (Livak, Schmittgen 2001). Se calculó el $\text{Log}_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$ para clasificar la expresión en sobreexpresión o infraexpresión y por ello el estándar pasó a ser >1 y <-1 .

Tabla 5 Secuencias de oligonucleótidos de los genes objetivo, relacionados con la formación de biofilm, necesarias para realizar la RT-PCR. F= forward y R=reverse.

Genes objetivo	Secuencia de Primers (5' – 3')	Referencia
16S ARNr	F: AGGCCTTCGGGTTGTAAAGT R: GTTAGCCGGTGCTTCTTCTG	(Lee <i>et al.</i> 2009)
<i>adrA</i>	F: GAAGCTCGTCGCTGGAAGTC R: TTCCGCTTAATTTAATGGCCG	(Latasa <i>et al.</i> 2005)
<i>csgD</i>	F: TCCTGGTCTTCAGTAGCGTAA R: TATGATGGAAGCGGATAAGAA	(Barak <i>et al.</i> 2005)
<i>sdiA</i>	F: AATATCGCTTCGTACCAC R: GTAGGTAAACGAGGAGCAG	(Halatsi <i>et al.</i> 2006)
<i>luxS</i>	F: ATGCCATTATTAGATAGCTT R: GAGATGGTTCGCGCATAAAGCCAGC	(Karavolos <i>et al.</i> 2008)
<i>hilA</i>	F: AATGGTCACAGGCTGAGGTG R: ACATCGTCGCGACTTGTGAA	(Salaheen <i>et al.</i> 2016)
<i>invA</i>	F: CGCGCTTGATGAGCTTTACC R: CTCGTAATTCGCCGCCATTG	(Salaheen <i>et al.</i> 2016)

Tabla 6 Secuencias de oligonucleótidos de los ARNs objetivo, relacionados con la formación de biofilm, necesarias para realizar la RT-PCR. F= forward y R=reverse

ARNs objetivo	Secuencia de Primers (5' – 3')	Referencia
RprA	F: AGCATGGAAATCCCCTGAGTG R: CATCGTAGGAGACGGGCAAA	Este estudio
ArcZ	F: ACTGCGCCTTTGACATCATC R: CGAATACTGCGCCAACACCA	Este estudio
OxyS	F: TAACCCTTGAAGACACCGCC R: ACCAGAGGTCCGCAAAAGTT	Este estudio
DsrA	F: CATCAGATTTCTGGTGTAACGAA R: CCTACGGGTCGGGATCAAACCT	(Ryan <i>et al.</i> 2016)
CsrB	F: CAAAGTGGAAGCGCAGGAT R: TGACCTTACGGCCTGTTCAT	Este estudio
SroC	F: GGGACTCCTGTCCTCTCGAT R: CAGCGCTACCCTCGAAGATT	Este estudio

3.6. CURVAS DE CRECIMIENTO

Los experimentos de crecimiento se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos de poliestireno y llenándolas de la misma manera que en el apartado 3.2.1. El crecimiento bacteriano se monitorizó antes de la incubación a 22°C (hora 0), y a las horas 1, 2, 6, 8, 23, 25, 30, 49 y 54. El crecimiento fue determinado midiendo la OD como en el apartado 3.2.2. Las microplacas fueron agitadas antes de la medición de la turbidez. Se calculó el ratio de crecimiento más elevado (μ ; $\Delta OD/h$) y se determinó el tiempo hasta la fase estacionaria (T) como la hora medida en la que no había aumento de OD.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos empleados fueron llevados a cabo mediante el programa SPSS para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.). El análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para estudiar la influencia de los medios de cultivo y la temperatura en la formación del biofilm en poliestireno y acero inoxidable. Se calcularon correlaciones de la expresión génica en cada uno de los medios de cultivo/residuos alimentarios mediante el método de correlaciones bivariadas (coeficientes de Pearson) con un nivel de significación $P < 0,05$.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MORFOLOGÍA DE LA COLONIA, PRODUCCIÓN DE CELULOSA Y MOTILIDAD

Una vez realizadas todas las pruebas, los resultados obtenidos son los expuestos en la Tabla 7. Se realizó un ANOVA para evaluar el efecto de la temperatura sobre la motilidad de las cepas (Tabla 8). Entre las temperaturas de 37, 30 y 22°C no hay diferencias significativas ($P = 0,05$) pero entre estas y 6°C si hay diferencias significativas ($P < 0,05$). En 2006, Wood y colaboradores, correlacionaron cómo las células planctónicas de *Escherichia coli* con mayor motilidad eran las que formaban biofilms más robustos (Wood *et al.* 2006). A 6°C es cuando la motilidad se reduce drásticamente, comparado con las otras temperaturas testadas, y esto indica junto con el morfotipo, que será a la temperatura que menos biofilms se formen o que incluso no se formen. A 22, 30 y 37°C al no haber diferencias significativas ($P = 0,05$), la motilidad no se considera un factor determinante en la diferencia de formación de biofilms en las diferentes temperaturas.

Tabla 7. Resultados de la morfología de la colonia de cada cepa (Morf.), la producción de celulosa (Cel.) y la motilidad (Mot.). SAW: smooth and white; BDAR: Brown, dry and rough; RDAR: red, dry and rough; SACW: smooth and completely white. T.C.: fluorescencia en toda la colonia; S.C.C.: fluorescencia solo en el centro de la colonia.

Cepa	37 °C				30 °C				22 °C				6 °C		
	Morf	Cel.	Mot. (cm)		Morf.	Cel.	Mot. (cm)		Morf.	Cel.	Mot. (cm)		Morf.	Cel.	Mot. (cm)
			72 h	96 h			72 h	96 h			72 h	96 h			
B2	SAW	T.C.	2,5	2,7	BDAR	S.C.C.	2,7	3	RDAR	T.C.	2	2,7	SACW	NO	0,1
ET1	SAW	T.C.	3	3,2	BDAR	S.C.C.	3	3,4	RDAR	T.C.	2,5	2,8	SACW	NO	0,2
I4	SAW	T.C.	1,5	1,6	BDAR	S.C.C.	2	2,4	RDAR	T.C.	1,5	1,7	SACW	NO	0,6
I5	SAW	T.C.	1,9	2,1	BDAR	S.C.C.	2	2,2	RDAR	T.C.	1,2	1,6	SACW	NO	0,1
I6	SAW	T.C.	1,7	1,8	BDAR	S.C.C.	1,8	2	RDAR	T.C.	1,3	1,7	SACW	NO	1,3
N2	SAW	T.C.	2,1	2,2	BDAR	S.C.C.	2,2	2,4	RDAR	T.C.	2	2,5	SACW	NO	0
N3	SAW	T.C.	1,7	1,8	BDAR	S.C.C.	2	2,5	RDAR	T.C.	1,9	2	SACW	NO	0,1
N5	SAW	T.C.	2,5	2,8	BDAR	S.C.C.	1,5	1,7	RDAR	T.C.	2	2,5	SACW	NO	0
T1	SAW	T.C.	1,9	2,1	BDAR	S.C.C.	3	3,1	RDAR	T.C.	1,5	2,5	SACW	NO	0
T4	SAW	T.C.	2,2	2,6	BDAR	S.C.C.	3	3,4	RDAR	T.C.	2	2,4	SACW	NO	0,6
T5	SAW	T.C.	2,4	2,7	BDAR	S.C.C.	3	3,2	RDAR	T.C.	2,4	2,5	SACW	NO	0,1
T6	SAW	T.C.	2,2	2,4	BDAR	S.C.C.	2	2,2	RDAR	T.C.	2	2,4	SACW	NO	0,2
AZ16	SAW	T.C.	2	2,1	BDAR	S.C.C.	1,6	2,1	RDAR	T.C.	1,5	1,8	SACW	NO	0,1

En todo el estudio se pudieron observar 4 morfotipos diferentes (Figura 4). A la mínima temperatura testada se expresa un morfotipo no descrito anteriormente en la bibliografía que se ha denominado *Soft and Completely White* (SACW). Este morfotipo no presenta fluorescencia de la colonia en el medio LB suplementado con calcoflúor, lo que indica que no hay producción de celulosa. En las otras condiciones de temperatura (22, 30 y 37°C), los morfotipos también son diferentes y las cepas que mostraron los morfotipo RDAR y SAW a 22 y 37°C respectivamente, presentaban fluorescencia en toda la colonia en el medio

empleado. Estos resultados se contradicen con la información de la Tabla 2, en que se muestra que las colonias que presentan morfotipo SAW no producen ni celulosa ni fimbrias curli. La razón por la que el morfotipo SAW presenta fluorescencia puede deberse a la interacción de otros componentes de la matriz extracelular, como el ácido colánico o la cápsula del antígeno O, con el calcoflúor que se une de manera inespecífica a polisacáridos con uniones β -1,3 y β -1,4. En 1969, Sutherland estudió la composición del ácido colánico mediante una hidrólisis ácida. Los componentes principales del ácido colánico son glucosa, galactosa, fucosa y ácido glucorónico que, cuando se unen entre ellos, forman compuestos con uniones β -1,3 y β -1,4 (entre otras), como por ejemplo β -glucosil-1,4-glucosa (Sutherland 1969). La cápsula del antígeno O está formada por más de 2300 unidades de tetrasacáridos cuyas uniones pueden tener conformación α o β (Gibson *et al.* 2006, Steenackers *et al.* 2012). Por todo esto, es probable que la fluorescencia observada en el morfotipo SAW, sea a causa de componentes como el ácido colánico o el antígeno de la capsula O y no haya producción de celulosa, demostrando que es correcto lo expuesto en la Tabla 2.

Tabla 8 Media de la motilidad a las temperaturas evaluadas. Las medias con diferentes letras tienen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ellas.

	TEMPERATURA			
	37 °C	30 °C	22 °C	6 °C
MOTILIDAD (cm)	2,123 ± 0,409 ^a	2,292 ± 0,568 ^a	1,831 ± 0,401 ^a	0,262 ± 0,371 ^b

En un estudio llevado a cabo por Lamas y colaboradores (2016) obtuvieron resultados de morfología de la colonia a 37°C similares a los de este trabajo, pero a las otras temperaturas que evaluó (20 y 28°C) había una mayor prevalencia del morfotipo RDAR (Lamas *et al.* 2016a). Esto se puede deber a una adaptación de las cepas a las condiciones del laboratorio por estar conservadas en medios enriquecidos con nutrientes. En 2008 Davidson y colaboradores demostraron que las cepas de *Salmonella* spp. perdían el morfotipo RDAR al pasar por el laboratorio. Las bacterias se regulan dos vías: (I) la vía σ^S , que le protege frente diferentes formas de estrés, en especial frente a un pH ácido y (II) la vía σ^{70} que le permite mejorar el aprovechamiento de nutrientes. A consecuencia de esto, se suelen producir mutaciones de delección o atenuación del gen *rpoS* (que codifica al factor σ^S) en las condiciones de laboratorio ya que en esta situación un mayor aprovechamiento de nutrientes puede proveer una ventaja selectiva para la bacteria (Davidson, White & Surette 2008). Esto explicaría por qué las mismas cepas utilizadas por Lamas y colaboradores en 2016 presentan un morfotipo diferente en este estudio, a pesar de que las condiciones testadas hayan sido muy similares.

El morfotipo RDAR está relacionado con la producción de celulosa y fimbrias curli y según los resultados obtenidos, a 22°C es cuando más probabilidades hay de formación de biofilm. La temperatura óptima para gallinas ponedoras es de 19 - 22°C y para Broilers en

crecimiento de 18 - 22°C (Lin *et al.* 2006). A 22°C el 100% (13) de las cepas presentaban el morfotipo RDAR que permite a la cepa sobrevivir fuera del hospedador formando biofilms, lo que causa que sea una fuente de contaminación constante para estas aves. Teniendo en cuenta que a dicha temperatura las cepas de *Salmonella* spp. testadas también presentan una motilidad elevada, los biofilms formados a 22°C serán más robustos y más difícil de erradicar.

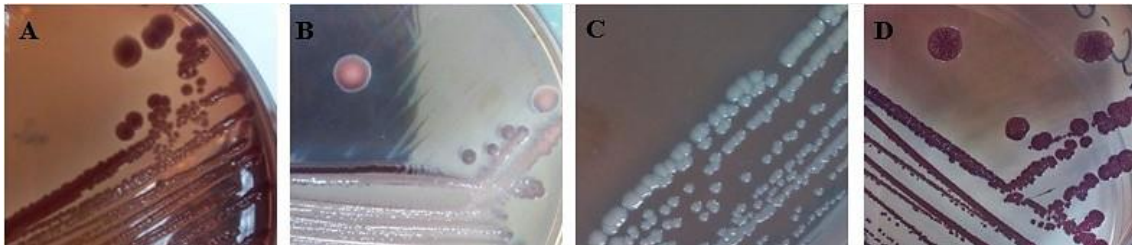


Figura 4 Diferentes morfotipos de *S. enterica* en agar Rojo Congo. (A) BDAR, (B) SAW, (C) SACW y (D) RDAR.

4.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS BIOFILMS FORMADOS

El pH de los medios analizados se muestra en la Tabla 9. El medio de 1/20 TSB suplementado con acetato sódico al 1% y la dilución de 1/20 leche tienen un pH ácido. Este pH puede favorecer que las cepas de *Salmonella* spp. sufran estrés ácido y se reduzcan los biofilms formados.

Tabla 9 Medición del pH de los diferentes medios de cultivo preparados (indicados en el apartado 3.2). Se hicieron 2 mediciones separadas por 1 minuto y el valor mostrado es la media de ambas mediciones.

MEDIO	pH
1/20 TSB	7,21
1/20 TSB + nitritos	7,11
1/20 TSB + sulfitos	7,14
1/20 TSB + acetato sódico (1%)	4,60
1/20 Leche	6,04

4.2.1. CUANTIFICACIÓN DE BIOFILMS EN MICROPLACAS DE POLIESTIRENO

Los resultados mostraron que todas las cepas de *Salmonella* spp. testadas en este trabajo producen biofilms en las placas de poliestireno en al menos uno de los medios testados. La OD₆₃₀ osciló desde $0,0100 \pm 0,0987$ a $0,7630 \pm 0,1248$. La formación de biofilms máxima se debió al serotipo Typhimurium (T4) en el medio de cultivo 1/20 TSB y la mínima se debió a *S. Infantis* (I5) en el medio con acetato sódico al 1%. El 50% (6 de 12) de las cepas estudiadas mostraron la capacidad de formar biofilms en todas las condiciones evaluadas. El valor de ODC utilizado para clasificar las cepas fue de 0,0700 (Tabla 10a y 10b). El análisis ANOVA mostró que el medio de cultivo utilizado, la temperatura y el tipo de cepa de *Salmonella* spp. afecta significativamente a la formación de biofilms ($P < 0,05$). Las condiciones donde menos biofilms se forman son 1/20 Leche a 37°C ($0,0731 \pm 0,0216$) y acetato sódico a 6°C ($0,0721 \pm 0,0137$) en los cuales el 12,5 y el 10,42% de las cepas respectivamente, no consiguieron formar biofilms.

La situación en la que más biofilms se forman es en el medio de 1/20 TSB suplementado con nitritos a 6°C ($0,4087 \pm 0,1594$). El uso de nitritos suele ser más habitual en embutidos, productos que se suelen conservar en neveras en un rango de temperatura de 4 – 8°C. Los resultados obtenidos sugieren que a esta temperatura los nitritos añadidos no estarán realizando su función antimicrobiana de manera adecuada, puesto que hay mayor formación de biofilms que en los medios y residuos alimentarios en los que no se añadieron conservantes (1/20 TSB, 1/20 leche y exudado de pollo). A esta temperatura los nitritos parecen favorecer la formación de biofilms en vez de evitarla a pesar de que la concentración de este conservante en el medio de cultivo fue la máxima permitida por la legislación. Esto supone un riesgo de contaminación de los alimentos que puede llevar a un brote alimentario. En cambio, en el medio suplementado con acetato sódico al 1% y a la misma temperatura (6 °C), solo consiguen formar biofilms 7 de las cepas y son biofilms débiles. En la Figura 5 se muestra como la formación de biofilms es mayor en el medio suplementado con nitritos que en los otros medios y residuos alimentarios evaluados. En contraposición, el conservante más eficaz es el acetato sódico y los valores registrados muestran que la mediana está por debajo de la OD umbral. En 2016, Lamas y colaboradores compararon la efectividad de un conservante compuesto por acetato sódico frente a nitrito sódico y sulfito sódico. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los conservantes que evaluaron, es decir la concentración mínima a la que el conservante es capaz de inhibir el crecimiento de bacteriano, era inferior para el acetato sódico que para los dos conservantes “clásicos” (Lamas *et al.* 2016b).

Analizando los valores totales, entre los medios de cultivo de 1/20 TSB y este medio suplementado con sulfitos y acetato sódico no hay diferencias significativas ($P = 0,05$), siendo de los medios en los que más biofilms se forman, después del medio de 1/20 TSB suplementado con nitritos. El residuo alimentario de exudado de pollo es en el que menos biofilms se forman ($0,0971 \pm 0,0265$). En este residuo alimentario, por falta de tiempo y de disponibilidad de exudado de pollo no se evaluó la formación de biofilms a 37°C. Se eligió descartar esta temperatura porque las cepas mostraban un morfotipo no relacionado con la formación de biofilms y porque en el otro residuo alimentario evaluado (1/20 Leche) no había diferencias significativas ($P = 0,05$) entre la formación de biofilms a 30 y 37°C.

Los residuos alimentarios no han sido muy estudiados en estas condiciones y los resultados obtenidos sugieren que la formación de biofilms tiende a ser débil. Li y colaboradores (2017) estudiaron la formación de biofilms por parte de *Salmonella* spp. en exudado de pollo a diferentes concentraciones comparándolo con un medio de cultivo comercial (caldo de cultivo Mueller Hinton). En el exudado de pollo a la máxima

concentración (100%) había una mayor formación de biofilms que en el medio de cultivo Mueller Hinton (Li *et al.* 2017). Estos resultados son contrarios a los obtenidos en este trabajo puesto que en este caso el exudado de pollo es el que tiene una media menor en cuanto a la formación de biofilms. En el presente trabajo se empleó 1/20 TSB, que es una dilución de un medio de cultivo comercial y por lo tanto habrá menos disponibilidad de nutrientes que en el utilizado en el estudio de Li y colaboradores (2017). La razón de haber obtenido resultados diferentes puede ser la concentración de nutrientes del exudado de pollo o una capacidad diferente de las cepas utilizadas en ambos estudios para el aprovechamiento de los nutrientes para la formación de biofilms, puesto que Li y colaboradores solo utilizaron cepas del serotipo Enteritidis y Typhimurium.

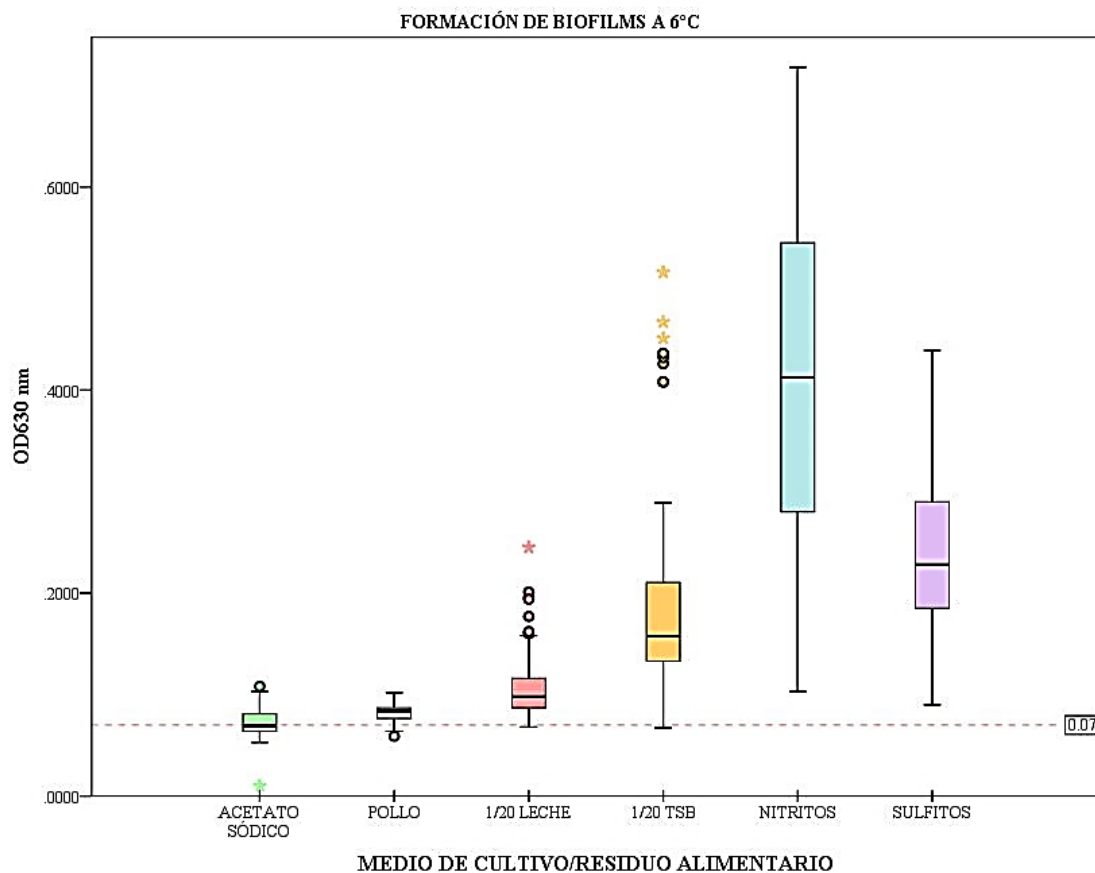


Figura 5 Diagrama de cajas de los valores de OD₆₃₀ de la formación de biofilms a 6°C en los diferentes medios de cultivo y residuos alimentarios utilizados. La caja se compone de dos cuartiles que cubren entre el 25 y 75% de los datos, con una línea negra que secciona la caja en dos que corresponde a la mediana, que representa el 50% de los datos. Los bigotes se representan los límites inferior y superior (1,5 del rango intercuartílico). Los círculos representan los valores atípicos (situados entre 1,5 y 3 del rango intercuartílico) y las estrellas los valores extremos (más alejados de 3 veces el rango intercuartílico). La línea discontinua representa la ODC, es decir, señala el punto de corte desde el que consideramos que hay formación de biofilms, de manera que los valores situados por debajo indican que no hay formación de biofilms.

En cuanto a la temperatura, a 22 °C hay mayor formación de biofilms ($0,2903 \pm 0,1444$) y es donde más biofilms fuertes se forman ya que el 54,5% (36 de 66) de los biofilms fuertes se forman en esta temperatura. En cambio, en el exudado de pollo no se forman biofilms fuertes y solo 1 cepa formó biofilms moderados, a 22 y 37°C. Piras y

colaboradores (2015) evaluaron la formación de biofilms de 40 cepas de *Salmonella* spp. aisladas en mataderos de cerdos a 22 y 35°C. Los resultados que obtuvieron con respecto a la formación de biofilms a las dos temperaturas de incubación, fueron que a 22°C la formación de biofilms era significativamente más elevada ($P < 0,01$) que a 35°C (Piras *et al.* 2015). Estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio en el que la formación de biofilms a 22°C es significativamente más elevada ($P < 0,05$) que en las otras temperaturas evaluadas (6, 30 y 37°C).

En cuanto a la media de formación de biofilms por cepa, la que más biofilms formó pertenecía *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (AZ16) ($0,3237 \pm 0,1573$) y la que menos al serotipo Infantis (I4) de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ($0,1013 \pm 0,0349$). Según los resultados obtenidos, la formación de biofilms es dependiente de la cepa y no del serotipo. En la Figura 6 se puede comprobar la variabilidad de las cepas de un mismo serotipo de *Salmonella* spp. en cuanto a la formación de biofilms. En el serotipo Infantis, existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las dos cepas evaluadas, siendo menores los valores de formación de biofilms por parte de la cepa I4 ($0,1075 \pm 0,0351$) que por parte de I5 ($0,2140 \pm 0,0279$). Otra situación diferente es la que se puede observar al evaluar la formación de biofilms por parte de las cepas evaluadas de *S. Typhimurium*. En este caso los valores de OD de la cepa T1 ($0,3054 \pm 0,0216$) eran significativamente más elevados ($P < 0,05$) que la de las otras cepas evaluadas. Sin embargo, entre la cepa T6 ($0,1590 \pm 0,0265$) y las cepas T5 ($0,1336 \pm 0,0206$) y T4 ($0,2261 \pm 0,0259$) no hay diferencias significativas ($P = 0,05$) a pesar de que si hay diferencias significativas ($P < 0,05$) entre T4 y T5. En 2012, Díez-García y colaboradores evaluaron la influencia del serotipo de cepas de *Salmonella* spp. en la formación de biofilms en microplacas de poliestireno a 37°C. Los resultados que obtuvieron mostraron que la habilidad de formar biofilms por parte de *Salmonella* spp. era serotipo dependiente (Díez-García, Capita & Alonso-Calleja 2012). Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que no es serotipo dependiente, sino que es cepa dependiente. La diferencia de resultados puede ser porque las cepas utilizadas en el estudio de Díez-García y colaboradores (2012) tenían características similares dentro del mismo serotipo y por la temperatura a la que evaluaron la formación de biofilms (37°C). En nuestro trabajo se han comparado 4 temperaturas diferentes y es a 6 y 22°C donde más diferencias hay con respecto a la formación de biofilms y además si solo hubiésemos evaluado las cepas T5 y T6 de *S. Typhimurium*, se hubiese concluido que la habilidad para producir biofilms es serotipo dependiente. Sin embargo, Lianou y Koutsomanis (2012) evaluando la formación de biofilms por parte de cepas de *Salmonella enterica* en diferentes condiciones de pH y temperatura concluyeron que la capacidad de formación de biofilms por parte de las cepas no era dependiente del

serotipo (Lianou, Koutsoumanis 2012). Estos resultados obtenidos por Lianou y Koutsoumanis (2012) concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo en cual concluimos que el serotipo no influye en la formación de biofilms en los diferentes medios de cultivo y en las diferentes temperaturas testadas. La diferencia de los resultados entre el estudio de Diez García y colaboradores (2012) y Lianou y Koutsoumanis (2012) no se considera que sea la cantidad de cepas evaluadas puesto que utilizaron 69 y 60 cepas, respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados de motilidad y morfotipo, a 22°C hay una elevada motilidad ($1,831 \pm 0,401$) y las cepas presentan el morfotipo RDAR. Entonces, a dicha temperatura no sólo se forman más biofilms, sino que serán biofilms más robustos y mejor protegidos frente a desinfectantes, antibióticos o conservantes pudiendo crear graves problemas de contaminación persistente para la industria alimentaria, la granja, etc.

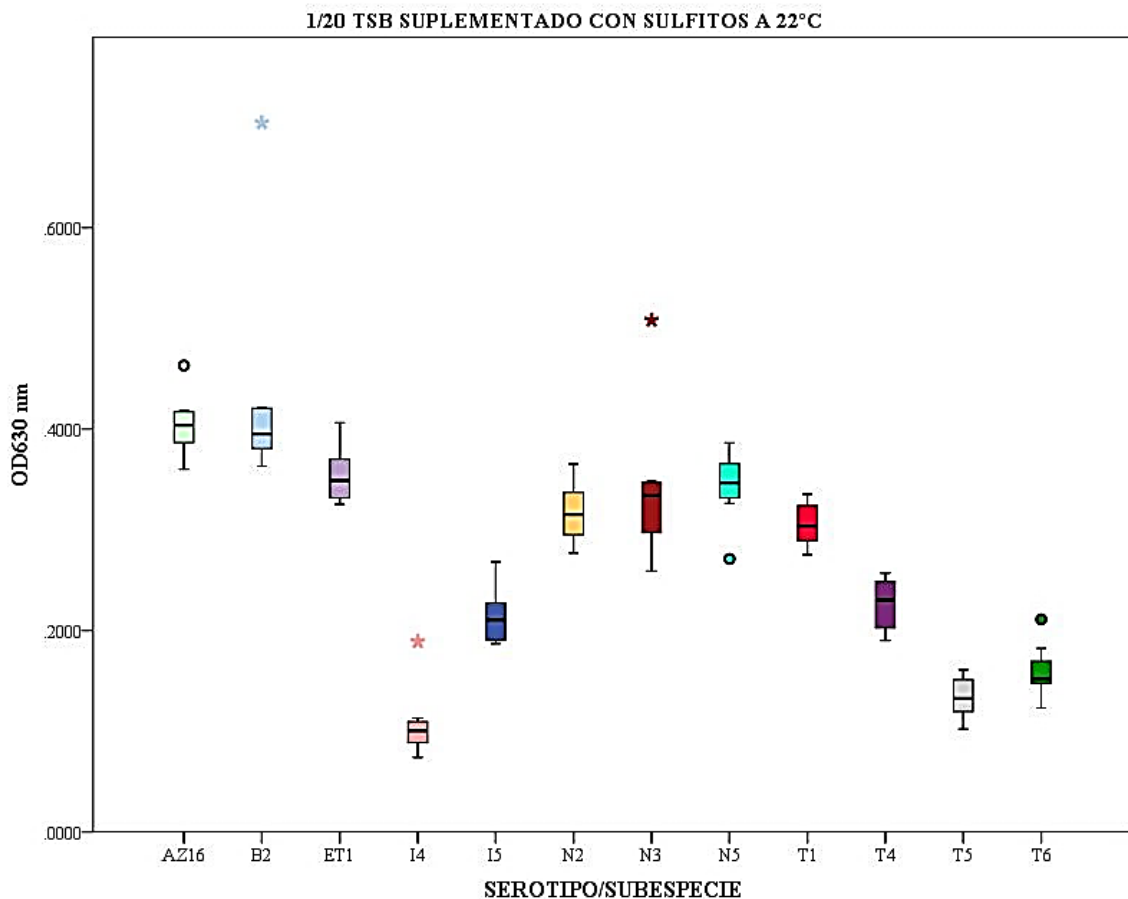


Figura 6 Diagrama de cajas de los valores de OD630 de la formación de biofilms de los diferentes serotipos/subespecies evaluados de *Salmonella* spp. a 22°C en el medio de cultivo 1/20 TSB suplementado con nitritos. La caja se compone de dos cuartiles que cubren entre el 25 y 75% de los datos, con una línea negra que secciona la caja en dos, que corresponde a la mediana, que representa el 50% de los datos. Los bigotes se representan los límites inferior y superior (1,5 del rango intercuartílico). Los círculos representan los valores atípicos (situados entre 1,5 y 3 del rango intercuartílico) y las estrellas los valores extremos (más alejados de 3 veces el rango intercuartílico).

Tabla 10 Las tablas a) y b) muestran producción de biofilms en microplacas de poliestireno de las 12 cepas de Salmonella spp. en los 6 medios de cultivo y a las 4 temperaturas testadas. Se expresa el número de cepas que forman cada tipo de biofilms y entre paréntesis el porcentaje de cepas de las testadas en un mismo medio y teniendo en cuenta todas las temperaturas que forman ese tipo de biofilms. La tabla c) muestra la media de OD que mostraron las cepas en cada medio a las distintas temperaturas y, en la columna terminal y fila terminal, la media de la OD en cada situación. Superíndices con distinta letra en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores, mientras que subíndices diferentes en una misma columna, indican diferencias significativas entre los valores de la misma columna. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P = 0,05$). N.D. = no determinado.

a)

BIOFILM	1/20 TSB, no (%)				NITRITOS, no (%)				SULFITOS, no (%)			
	6 °C	22 °C	30 °C	37 °C	6 °C	22 °C	30 °C	37 °C	6 °C	22 °C	30 °C	37 °C
No formación	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Débil	3 (6,25)	1 (2,08)	3 (6,25)	5 (10,42)	0 (0)	0 (0)	3 (6,25)	4 (8,33)	2 (4,17)	2 (4,17)	3 (6,25)	8 (16,67)
Moderado	8 (16,67)	2 (4,17)	7 (14,58)	7 (14,58)	3 (6,25)	3 (6,25)	4 (8,33)	7 (14,58)	6 (12,50)	3 (6,25)	4 (8,33)	3 (6,25)
Fuerte	1 (2,08)	9 (18,75)	2 (4,17)	0 (0)	9 (18,75)	9 (18,75)	5 (10,42)	1 (2,08)	4 (8,33)	7 (14,58)	5 (10,42)	1 (2,08)

b)

BIOFILM	1/20 LECHE, no (%)				ACETATO SÓDICO 1%, no (%)				E. POLLO, no (%)			
	6 °C	22 °C	30 °C	37 °C	6 °C	22 °C	30 °C	37 °C	6 °C	22 °C	30 °C	37 °C
No formación	0 (0)	0 (0)	3 (6,25)	6 (12,50)	5 (10,42)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N.D.
Débil	11 (22,92)	2 (4,17)	9 (18,75)	6 (12,50)	7 (14,58)	1 (2,08)	1 (2,08)	1 (2,08)	12 (33,33)	11 (30,55)	11 (30,55)	N.D.
Moderado	1 (2,08)	8 (16,67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (4,17)	10 (20,83)	10 (20,83)	0 (0)	1 (2,78)	1 (2,78)	N.D.
Fuerte	0 (0)	2 (4,17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (18,75)	1 (2,08)	1 (2,08)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N.D.

c)

TEMP.	MEDIO							TOTAL
	1/20 TSB	NITRITOS	SULFITOS	1/20 LECHE	ACETATO SÓDICO	E. POLLO		
6°C	0,1878 ± 0,0957 ^c _b	0,4087 ± 0,1594 ^a _a	0,2349 ± 0,0775 ^b _b	0,1072 ± 0,0313 ^d _b	0,0721 ± 0,0137 ^d _d	0,0821 ± 0,0085 ^d _b	0,1916 ± 0,1466 _b	
22°C	0,3716 ± 0,1458 ^a _a	0,3530 ± 0,1242 ^a _b	0,278 ± 0,112 ^b _a	0,1936 ± 0,0901 ^c _a	0,3458 ± 0,1323 ^a _a	0,1092 ± 0,0336 ^d _a	0,2903 ± 0,1444 _a	
30°C	0,199 0 ± 0,0858 ^b _b	0,2268 ± 0,0987 ^{a,b} _c	0,264 ± 0,133 ^a _{a,b}	0,0825 ± 0,0238 ^c _c	0,2340 ± 0,0738 ^{a,b} _b	0,1002 ± 0,0235 ^c _a	0,1920 ± 0,1090 _b	
37°C	0,1635 ± 0,0797 ^c _b	0,1730 ± 0,0734 ^b _d	0,126 ± 0,060 ^d _c	0,0731 ± 0,0216 ^c _c	0,2019 ± 0,0601 ^c _c	N. D.	0,1475 ± 0,0763 _c	
TOTAL	0,2305 ± 0,1335 ^b	0,2904 ± 0,1511 ^a	0,226 ± 0,116 ^b	0,1141 ± 0,0693 ^c	0,2134 ± 0,1273 ^b	0,0971 ± 0,0265 ^c		

4.2.2. CUANTIFICACIÓN DE BIOFILMS EN PLACAS DE ACERO INOXIDABLE

Los resultados obtenidos de la OD₆₃₀ oscilan desde $0,4700 \pm 0,0083$ hasta $0,2670 \pm 0,0091$. El valor máximo de OD fue mostrado por *Salmonella enterica* subsp. *salamae* y el valor mínimo por el serotipo Infantis (I4) de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. En ninguno de los medios testados se formaron biofilms fuertes y en el acetato sódico al 1% ninguna de las cepas formó biofilms (Tabla 11). En el medio de exudado de pollo solo se determinó capacidad de formación de biofilms de 6 de las 10 cepas puesto que, por falta de tiempo y de disponibilidad de pollos, se decidió escoger aquellas cepas de *Salmonella* spp. en las que se estudió la expresión génica (AZ16, B2, ET1, N5, I5, T1). En cuanto a los valores totales de OD (Tabla 12), en el medio 1/20 TSB hay diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a los demás medios de cultivo y residuos alimentarios, siendo el que tiene los valores de formación de biofilms más elevados. La formación de biofilms en el medio de cultivo de 1/20 TSB suplementado con acetato sódico también muestra diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a los otros medios y residuos alimentarios evaluados, siendo el único en el que no se forman biofilms. Entre los valores de OD en el medio de 1/20 TSB suplementado con sulfitos y el residuo alimentario compuesto por la disolución 1/20 de leche, no hay diferencias significativas ($P = 0,05$). Según lo estudiado, el único conservante que ha tenido efecto en la erradicación de biofilms es el acetato sódico al 1% cuyo valor medio de OD es $0,0590 \pm 0,0077$. Excepto el medio suplementado con acetato sódico, todos los medios y residuos alimentarios evaluados presentaban formación de biofilms en el acero inoxidable.

Comparando los resultados obtenidos en poliestireno con los obtenidos en acero inoxidable (Figura 7) la tendencia que siguen estos valores es de una mayor formación de biofilms en poliestireno. En el acetato sódico la diferencia entre las dos superficies es muy marcada mientras que en el exudado de pollo los valores están dentro del mismo rango. No se puede hacer una comparativa directa entre ambos resultados ya que la metodología utilizada es diferente y puede llevar a diferencias de formación de biofilms entre las dos superficies sin ser reales. La tendencia que siguen los valores en cuanto a los medios de cultivo con mayor formación de biofilms, 1/20 TSB y 1/20 TSB suplementado con nitritos, y aquellos con menor formación de biofilms, residuos de alimentos y acetato sódico, es similar en ambas superficies.

Si bien hay variedad de artículos científicos que evalúan el crecimiento de cepas de *Salmonella* spp. en acero inoxidable, no se ha encontrado ningún estudio que compare la formación de biofilms de cepas de diferentes serotipos/subespecies en diferentes medios de cultivo y residuos alimentarios. Joseph y colaboradores (2001) evaluaron la susceptibilidad a desinfectantes de dos cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de

pollos sembradas en superficies como acero inoxidable y cristal (Joseph *et al.* 2001). Kuda y colaboradores (2015, 2016) estudiaron el efecto de la cantidad de residuos de alimentos, zumo de zanahoria y leche, en la supervivencia de los biofilms de *Salmonella* spp en acero inoxidable a tratamientos de desecación y desinfectantes (Kuda *et al.* 2015, Kuda *et al.* 2016). En estos dos estudios utilizaron solo una cepa de *S. Typhimurium* y compararon el número de células viables antes y después del tratamiento de desinfección. En el presente trabajo se ha comparado la formación de biofilms en los diferentes medios utilizando diferentes serotipos y subespecies de *Salmonella* spp. para poder relacionar cómo se comporta cada serotipo/subespecie dependiendo de las distintas condiciones ambientales. De Oliveira y colaboradores (2014) incubaron 174 cepas de *Salmonella* spp. sin serotipar, en un medio de cultivo de infusión de cerebro y corazón y evaluaron la formación de biofilms en tres superficies diferentes (PVC, acero inoxidable y cristal) y a cuatro temperaturas diferentes (16, 20, 28 y 35°C) habiendo analizado antes el morfotipo de cada cepa (De Oliveira, D. C. *et al.* 2014). La gran diferencia del estudio realizado por De Oliveira y colaboradores (2014) y el que se ha llevado a cabo en este trabajo, es el serotipado de las cepas puesto que una de las evaluaciones realizadas es la formación de biofilm comparada entre las diferentes cepas en las diferentes superficies.

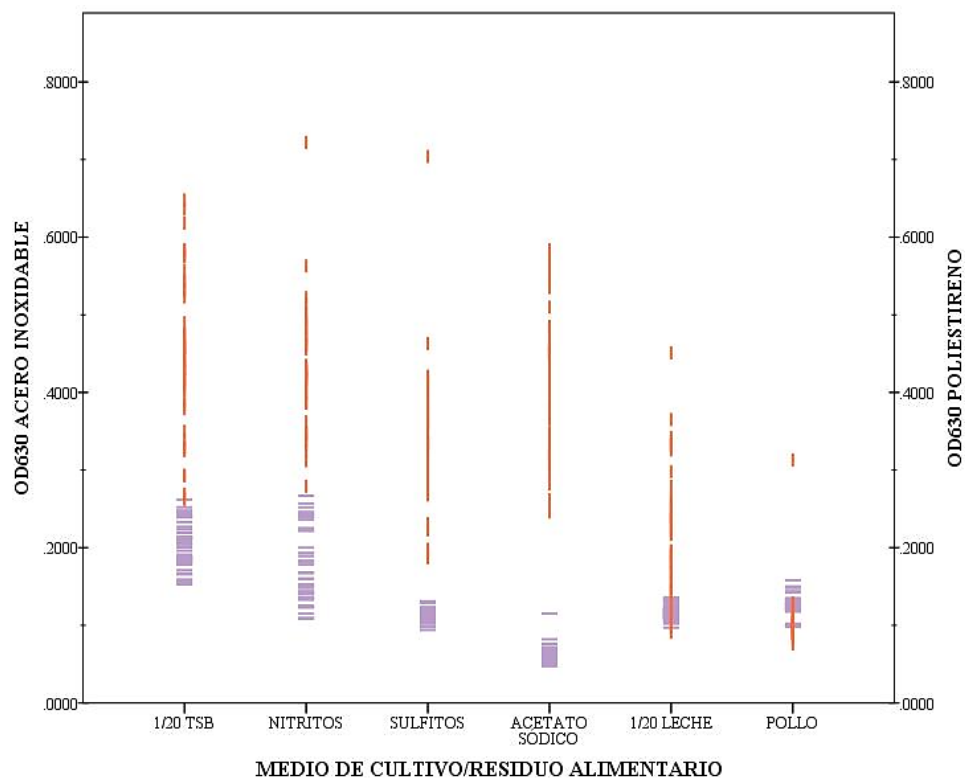


Figura 7 Valores de OD 630 nm en las dos superficies testadas, poliéstireno y acero inoxidable. Las líneas verticales de color rojo representan los valores de OD en poliéstireno y las líneas horizontales violetas representan los valores de OD en acero inoxidable. Solo están incluidas las cepas de *Salmonella* spp. testadas en todos los medios de cultivo y residuos alimentarios (AZ16, B2, ET1, N5, T1 e I5).

Tabla 11. Producción de biofilms en acero inoxidable en las 10 cepas de *Salmonella* spp. evaluadas en los medios de cultivo de 1/20 TSB, nitritos, sulfitos, 1/20 leche y acetato sódico 1%. En el medio de exudado de pollo solo se evaluaron 6 cepas por limitación de tiempo y producto, se eligieron las cepas a las que se evaluó la expresión génica. Se expresa el número de cepas que forman cada tipo de biofilms y entre paréntesis el porcentaje de cepas de las testadas en un mismo medio y teniendo en cuenta todas las temperaturas que forman ese tipo de biofilms.

BIOFILM	MEDIO DE CULTIVO					
	1/20 TSB, no (%)	NITRITOS, no (%)	SULFITOS, no (%)	1/20 LECHE	A. SÓDICO 1%, no (%)	E. POLLO, no (%)
No formación	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	10 (100)	0 (0)
Débil	4 (40)	7 (70)	9 (90)	10 (100)	0 (0)	6 (100)
Moderado	6 (60)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Fuerte	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tabla 12 Media de OD que mostraron las cepas de *Salmonella* spp. en acero inoxidable en cada medio de cultivo. Superíndices con distinta letra en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P = 0,05$). N.D. = no determinado.

CEPA	MEDIO DE CULTIVO					
	1/20 TSB	NITRITOS	SULFITOS	1/20 LECHE	A. SÓDICO 1%	E. POLLO
AZ16	0,1880 ± 0,0095 ^b	0,2490 ± 0,0091 ^a	0,1129 ± 0,0088 ^d	0,1148 ± 0,0090 ^{c,d}	0,0591 ± 0,0089 ^e	0,1294 ± 0,0131 ^c
B2	0,1820 ± 0,0084 ^a	0,1400 ± 0,1099 ^b	0,1071 ± 0,0086 ^d	0,1210 ± 0,0087 ^c	0,0573 ± 0,0071 ^e	0,1341 ± 0,0113 ^{b,c}
ET1	0,2466 ± 0,0075 ^a	0,1834 ± 0,0086 ^b	0,1130 ± 0,0087 ^c	0,1090 ± 0,0086 ^c	0,0575 ± 0,0073 ^d	0,1073 ± 0,0085 ^c
N5	0,1616 ± 0,0094 ^a	0,1510 ± 0,0092 ^a	0,1123 ± 0,0068 ^b	0,1219 ± 0,0080 ^b	0,0579 ± 0,0069 ^c	0,1504 ± 0,0087 ^a
T1	0,2124 ± 0,0101 ^a	0,1188 ± 0,0099 ^b	0,1164 ± 0,0078 ^b	0,1179 ± 0,0083 ^b	0,0615 ± 0,0095 ^c	0,1268 ± 0,0115 ^b
I5	0,2184 ± 0,0122 ^a	0,2263 ± 0,0131 ^a	0,1183 ± 0,0066 ^c	0,1038 ± 0,0079 ^d	0,0591 ± 0,0086 ^e	0,1386 ± 0,0085 ^b
I4	0,1296 ± 0,0105 ^a	0,1325 ± 0,0081 ^a	0,0951 ± 0,0074 ^c	0,1096 ± 0,0079 ^b	0,0585 ± 0,0083 ^d	N.D.
T4	0,2281 ± 0,0104 ^a	0,1678 ± 0,0108 ^b	0,0986 ± 0,0089 ^c	0,1065 ± 0,0117 ^c	0,0599 ± 0,0076 ^d	N.D.
T5	0,1721 ± 0,0100 ^a	0,1200 ± 0,0095 ^b	0,0885 ± 0,0095 ^c	0,1060 ± 0,0117 ^b	0,0589 ± 0,0082 ^d	N.D.
T6	0,1238 ± 0,0067 ^{a,b}	0,1345 ± 0,0086 ^a	0,1205 ± 0,0093 ^{b,c}	0,1109 ± 0,0089 ^c	0,0603 ± 0,0084 ^d	N.D.
TOTAL	0,1863 ± 0,0401 ^a	0,1623 ± 0,0438 ^b	0,1083 ± 0,0129 ^d	0,1121 ± 0,0106 ^d	0,0590 ± 0,0077 ^e	0,1311 ± 0,0166 ^c

4.3. EXPRESIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON LOS BIOFILMS Y EL *QUORUM SENSING*

En cuanto a la expresión de los genes/ARNs evaluados, las diferencias significativas ($P < 0,05$) dependieron del gen, del medio y de la cepa evaluada. En cuanto al gen de QS *luxS*, no se expresó en ninguna de las cepas y en ninguno de los medios. Todos los datos de expresión génica se muestran en la Tabla 18 y la Tabla 19 y los datos de la correlación entre genes en cada medio de cultivo en la Tabla 13, Tabla 14, Tabla 15, Tabla 16 y Tabla 17. Excepto en la expresión del ARNs DsrA, el medio de cultivo influyó de manera significativa ($P < 0,05$) sobre la expresión de todos los genes/ARNs. En los únicos genes/ARNs en los cuales no hubo diferencias significativas ($P = 0,05$) en cuanto a la expresión dependiendo de la cepa fueron CsrB y OxyS. *Salmonella Salamae* (AZ16) y la cepa del serotipo Typhimurium (T1) son las que mostraron valores más similares de expresión génica total, teniendo en cuenta todos los medios, y no hubo diferencias significativas ($P = 0,05$) en ninguno de los genes/ARNs evaluados. Al haber analizado estos datos junto con los resultados del medio, hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) en la expresión de los genes/ARNs evaluados en ambas cepas. Si comparamos la Figura 8 y la Figura 9 se puede ver de forma visual como varió la expresión de los mismos genes/ARNs dependiendo del medio y de la cepa evaluada.

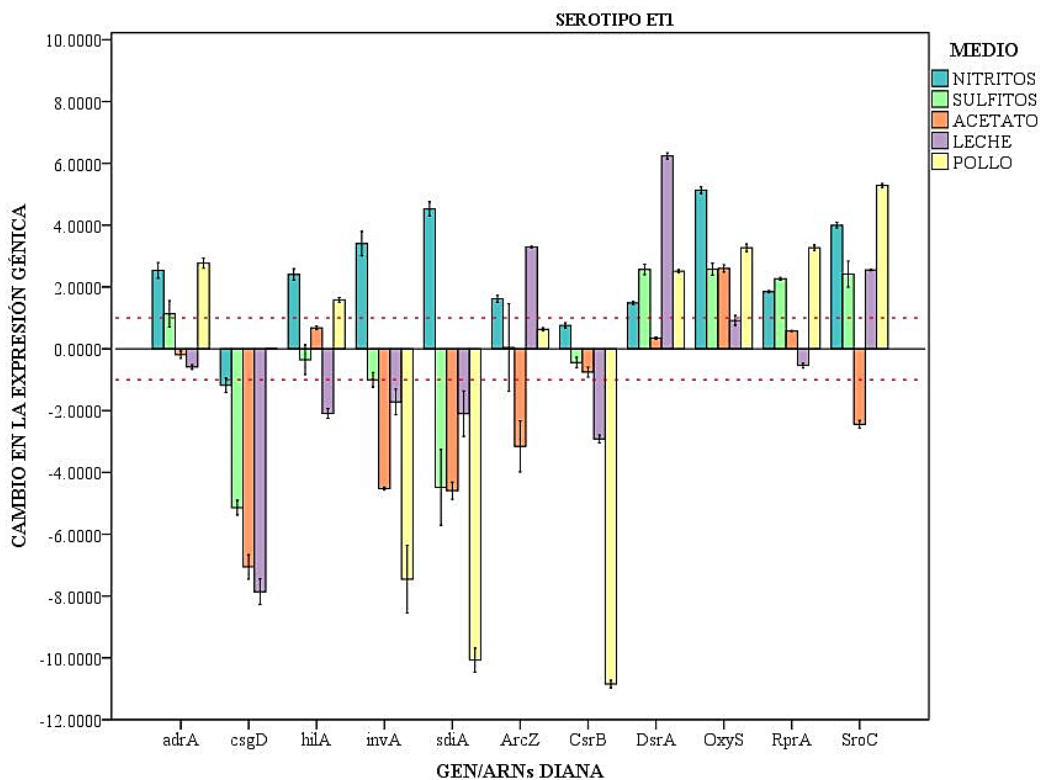


Figura 8 Expresión de los genes y ARNs relacionados la formación de biofilms, *quorum sensing* y virulencia en los diferentes medios de cultivo/residuos alimentarios utilizados, normalizada con el gen de referencias 16S rRNA. La cepa representada pertenece a *Salmonella* Enteritidis. Las barras de error representan +/- 1 desviación estándar. Las líneas discontinuas transversales representan el punto al partir del cual se considera que el cambio en la expresión génica es significativo (+1/-1).

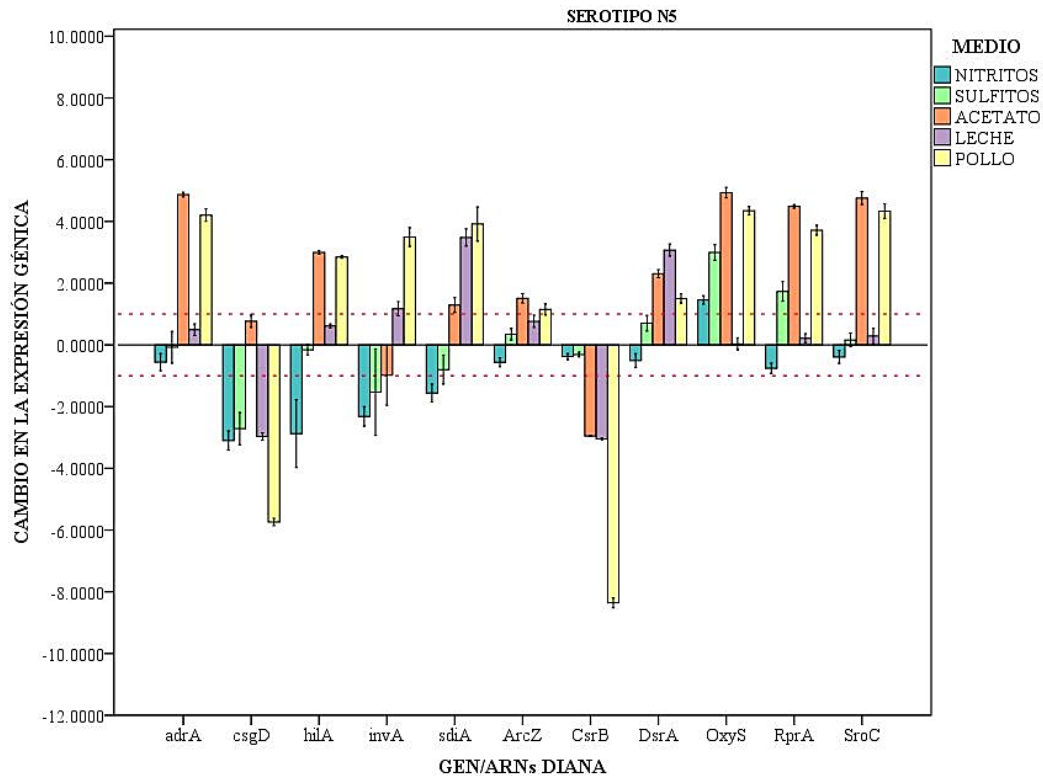


Figura 9 Expresión de los genes y ARNs relacionados la formación de biofilms, *quorum sensing* y virulencia en los diferentes medios de cultivo/residuos alimentarios utilizados, normalizada con el gen de referencias 16S rRNA. La cepa representada pertenece a *Salmonella* Newport. Las barras de error representan ± 1 desviación estándar. Las líneas discontinuas transversales representan el punto a partir del cual se considera que el cambio en la expresión génica es significativo ($+1/-1$).

CsgD es la unidad principal de control de la formación de biofilms y el gen que codifica a dicho regulador, *csgD*, estuvo infraexpresada en todos los medios y en todas las cepas. Las excepciones en las que había sobreexpresión fueron *S. Infantis* (I5) en el medio suplementado con sulfitos ($0,3850 \pm 0,1000$) y *S. Newport* (N5) en el medio suplementado con acetato sódico al 1% ($0,7683 \pm 0,1991$) pero estos valores no se consideraron significativos ($\text{Log}_2(2^{\Delta\Delta C_t}) < 1$). En el caso del exudado de pollo, solo se determinó expresión en tres de las cepas (AZ16, N5 y T1) siendo indeterminada en las otras cepas. CsgD controla de manera positiva la expresión de AdrA uniéndose de manera directa a *adrA* (Steenackers *et al.* 2012). AdrA regula de manera positiva la síntesis de celulosa produciendo c-di-GMP que activa de forma alostérica a la celulosa sintasa, BcsA (Simm *et al.* 2014). Al contrario que *csgD*, la expresión de *adrA* varió dependiendo del medio y de la cepa evaluada y estuvo en algunos casos infraexpresado y en otros sobreexpresado. Solo se obtuvo una correlación positiva significativa entre ambos genes en el caso del medio suplementado con nitritos y el medio suplementado con acetato sódico $0,548$ ($P < 0,05$) y $0,718$ ($P < 0,01$), respectivamente.

En cuanto a los genes de virulencia *hilA* e *invA* hubo una correlación positiva significativa ($P < 0,01$) entre ambos en todos los medios de cultivo salvo en el exudado de pollo. En el residuo alimentario de pollo, *hilA* estuvo sobreexpresado en todas las cepas oscilando desde $1,3526 \pm 0,1991$ (T1) hasta $3,5703 \pm 0,1230$ (B2). En cambio, *invA* en el mismo residuo

estuvo sobreexpresado en AZ16 y N5, infraexpresado en ET1 y en las otras cepas evaluadas (B2, I5 y T1) no hubo variaciones significativas. El ARNm de *hilA* regula de manera coordinada la transcripción de los genes de invasión en respuesta a señales ambientales reduciéndose su expresión, junto con la de *invA*, cuando las condiciones no son favorables para dicha invasión (oxígeno elevado, osmolaridad baja, pH ácido...) (Jones 2005). Esto se corresponde con la correlación explicada anteriormente en los medios de cultivo y en el residuo alimentario de leche. Además, en cada situación en la que *hilA* estaba infraexpresado *invA* también lo estaba y aunque no fuesen cambios significativos en la expresión de *hilA* si lo eran en *invA*, pero esta norma no se cumplió en la dirección opuesta. En 2015, O'Leary y colaboradores analizaron la expresión génica de *hilA* e *invA* en tres cepas de *S. Typhimurium* exponiéndolas a dos condiciones diferentes de pH (5 y 7) obteniendo una sobreexpresión de ambos genes en todas las condiciones testadas a excepción de cuando aumentó la cantidad de nutrientes del medio, ya que ambos genes pasaron a estar infraexpresados (O'Leary *et al.* 2015). Esto no concuerda con lo obtenido en nuestro trabajo puesto que, en los medios ácidos, 1/20 TSB suplementado con acetato sódico (pH = 4,60) y 1/20 leche (pH = 6,04), la expresión de dichos genes no varió en función de la acidez, sino que la variación fue en función de la cepa y de la eficacia del conservante utilizado. Cabe destacar la correlación positiva entre estos genes de virulencia e invasión celular con los genes de formación de biofilms (*csgD* y *adrA*), que fue muy marcada ($P < 0,01$) en el medio suplementado con nitritos, siendo la única excepción a esta tendencia en el exudado de pollo, residuo alimentario en el que hubo una correlación negativa entre *csgD* e *invA* ($P < 0,01$). Esto indica que cuando hay persistencia de biofilms en el entorno, superficie o alimentos con conservantes, las bacterias que lo forman tendrán más expresados dichos genes de virulencia siendo más peligrosas para la salud humana, pero en pollos cuanto más biofilms se formen menor virulencia tendrán dichas bacterias.

Como se ha comentado anteriormente, la expresión génica de *luxS* fue indeterminada y en cambio, la del gen *sdiA* fue cuantificada en todas las situaciones salvo en el exudado de pollo. El gen *luxS* es el encargado de producir las moléculas de señalización del QS (AI-2) y el gen *sdiA* codifica al receptor de las moléculas de acil-homoserina lactona (AHL) producidas por otras especies bacterianas. *sdiA* se correlacionó de forma positiva con *csgD* ($P < 0,01$) en todos los medios de cultivo excepto en el suplementado con acetato sódico, situación en la cual la correlación no fue significativa ($P = 0,05$), y en el exudado de pollo en el que la correlación fue negativa ($P < 0,01$). Los genes relacionados con el QS también tienen una función reguladora de la expresión de los genes de virulencia (Bai, Rai 2011). El gen *sdiA* estuvo correlacionado positivamente de manera significativa ($P < 0,01$) con los dos genes de

virulencia evaluados (*hilA* e *invA*) salvo en la leche y en el caso del exudado de pollo, ya que la correlación con *hilA* en este residuo alimentario no fue significativa ($P = 0,05$).

Los ARNs tienen diversas funciones y es por eso que los que se han evaluado en este trabajo se pueden clasificar en tres grupos: anti-flagelos/probiofilms, anti-flagelos/antibiofilms y múltiples efectos complejos. ArcZ y DsrA estimulan la expresión del ARNm de *csgD* y a la vez reprimen la expresión de *flhDC* (Mika, Hengge 2013). No se determinó ninguna correlación significativa ($P = 0,05$) entre ambos ARNs, pero la tendencia fue negativa excepto en el medio suplementado con sulfitos. Este concepto no se puede aplicar de forma global ya que a pesar de que la tendencia de correlación de ArcZ con los genes de formación de biofilms (*csgD* y *adrA*) fue positiva, en el caso de DsrA fue al revés. CsrB favorece la formación de biofilms y está englobado dentro de un sistema complejo de dos componentes conocido como sistema BarA/SirA que regula la virulencia, la motilidad y la formación de biofilms por parte de *Salmonella* spp. (Steenackers *et al.* 2012). SirA activa la expresión de CsrB y CsrC (ARNs) cuya función es inhibir la actividad de CsrA, la cual es una proteína que favorece la expresión de *flhDC* e *hilA* reduciendo así la formación de biofilms (Teplitski, Al-Agely & Ahmer 2006). CsrB estuvo infraexpresado en todos los medios y cepas salvo en *S. Bardo* y *S. Enteritidis* en el medio suplementado con nitritos, en el serotipo Infantis en los dos medios con conservantes “clásicos” y en *Salmonella* Typhimurium en el medio adicionado con sulfitos. En el exudado de pollo los valores de infraexpresión de CsrB fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) a los valores en los otros medios y es donde más infraexpresado estuvo dicho ARNs. CsrB está influenciado por *sdia* ya que dicho gen actúa sobre el sistema BarA/SirA favoreciendo la expresión de CsrB y la inhibición de CsrA (Steenackers *et al.* 2012). En el medio de 1/20 TSB suplementado con nitritos y el medio suplementado con sulfitos hubo una correlación positiva significativa ($P < 0,01$) entre *sdia* y CsrB, pero en la leche la correlación fue negativa ($P < 0,05$). OxyS, que es un ARNs que se expresa en situaciones de estrés oxidativo forma parte del grupo anti-flagelos/antibiofilms, en cambio en el medio de cultivo suplementado con nitritos mostró una correlación positiva significativa ($P < 0,01$) con todos los genes/ARNs testados excepto con DsrA y ArcZ. Además, evaluando los valores comparativos, todas las cepas presentaban sobreexpresión de OxyS en dicho medio excepto la cepa del serotipo Typhimurium en la cual el cambio de expresión no fue significativo ($\text{Log}_2(2^{-\Delta\Delta Ct}) < 1$). Al relacionarlo con los resultados de formación de biofilms en placas poliestireno y en acero inoxidable en los cuales este medio mostraba resultados de alta formación de biofilms, se puede suponer que este conservante de alguna manera favorece la formación de biofilms actuando a nivel de la expresión génica. Dependiendo de la expresión de RprA puede provocar una infraexpresión de CsgD al estar sobreexpresado, o favorecer la expresión del factor σ^S (RpoS), que actúa directamente sobre CsgD fomentando su expresión (Mika,

Hengge 2013, Mika *et al.* 2012). SroC, ARNs anti flagelos/probiofilms, modula negativamente la motilidad bacteriana induciendo la formación de biofilms de manera significativa cuando se encuentra sobreexpresado (Fuentes *et al.* 2015). En el residuo alimentario de exudado de pollo este ARNs se encontraba sobreexpresado a pesar de no correlacionarse de manera significativa con ninguno de los genes/ARNs evaluados. SroC y RprA se correlacionaron positivamente de manera significativa ($P < 0,01$) en todos los medios de cultivo suplementados con conservantes no siendo así en los residuos alimentarios testados. A RprA lo englobamos dentro del tercer grupo puesto que tiene una actividad compleja dependiendo de diversos factores, como la expresión del mismo. En el exudado de pollo estuvo sobreexpresado en todas las cepas excepto en *Salmonella salamae* y en este residuo alimentario se encontraba correlacionado positivamente ($P < 0,01$) con la expresión de *csgD* lo que puede indicar que a pesar de estar sobreexpresado no lo estaba lo suficientemente como para influir sobre CsgD. En cambio, en el medio suplementado con nitritos RprA se correlacionó positivamente con todos los genes/ARNs evaluados excepto con DsrA, a pesar de que ambos ARNs actúen sobre el factor σ^S .

Tabla 13 Correlación con coeficientes de Pearson entre los niveles de expresión de cada gen en el medio de cultivo de 1/20 suplementado con nitritos.

NITRITOS											
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdia</i>	ArcZ	CsrB	DsrA	OxyS	RprA	SroC
<i>adrA</i>	1	0,548*	0,830**	0,881**	0,935**	0,731**	0,899**	0,086	0,645**	0,956**	0,907**
<i>csgD</i>		1	0,766**	0,796**	0,610**	0,329	0,756**	0,023	0,848**	0,529*	0,624**
<i>hilA</i>			1	0,911**	0,844**	0,603**	0,908*	-0,118	0,764**	0,866**	0,843**
<i>invA</i>				1	0,914**	0,625**	0,940**	0,168	0,899**	0,865**	0,928**
<i>sdia</i>					1	0,727**	0,873**	0,192	0,730**	0,947**	0,983**
ArcZ						1	0,555*	-0,129	0,468	0,793**	0,772**
CsrB							1	0,024	0,843**	0,869**	0,867**
DsrA								1	0,184	-0,023	0,179
OxyS									1	0,637**	0,792**
RprA										1	0,929**
SroC											1

* $P < 0,05$
** $P < 0,01$

Tabla 14 Correlación con coeficientes de Pearson entre los niveles de expresión de cada gen en el medio de cultivo de 1/20 suplementado con sulfitos.

SULFITOS											
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdia</i>	ArcZ	CsrB	DsrA	OxyS	RprA	SroC
<i>adrA</i>	1	-0,246	0,342	0,423	0,095	0,001	0,141	-0,196	0,194	0,406	0,480*
<i>csgD</i>		1	0,259	0,387	0,617**	0,191	0,461	-0,459	-0,499*	-0,220	-0,317
<i>hilA</i>			1	0,788**	0,635**	0,424	0,646**	-0,368	0,221	0,574*	0,492*
<i>invA</i>				1	0,673**	0,28	0,698**	-0,514*	0,055	0,519*	0,450
<i>sdia</i>					1	0,675**	0,865**	-0,130	0,246	0,577*	0,351
ArcZ						1	0,677**	0,289	0,397	0,599*	0,403
CsrB							1	-0,099	0,334	0,721**	0,581*
DsrA								1	0,535*	0,217	0,223
OxyS									1	0,790**	0,789**
RprA										1	0,874**
SroC											1

* $P < 0,05$
** $P < 0,01$

Tabla 15 Correlación con coeficientes de Pearson entre los niveles de expresión de cada gen en el medio de cultivo de 1/20 suplementado con acetato sódico al 1%

ACETATO SÓDICO 1%											
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdiA</i>	ArcZ	CsrB	DsrA	OxyS	RprA	SroC
<i>adrA</i>	1	0,718**	0,242	0,503*	0,352	0,771**	-0,314	-0,274	-0,128	0,715**	0,768**
<i>csgD</i>		1	0,195	0,505*	0,288	0,582*	-0,545*	-0,087	-0,217	0,442	0,561*
<i>hilA</i>			1	0,684**	0,551*	0,207	-0,141	-0,188	0,742**	0,444	0,326
<i>invA</i>				1	0,417	0,403	-0,584*	-0,549*	0,311	0,377	0,437
<i>sdiA</i>					1	0,531*	-0,436	0,001	0,746**	0,796**	0,778**
ArcZ						1	-0,409	-0,394	0,076	0,843**	0,906**
CsrB							1	0,193	-0,054	-0,207	-0,418
DsrA								1	0,060	-0,216	-0,275
OxyS									1	0,423	0,287
RprA										1	0,962**
SroC											1

* $P < 0,05$
 ** $P < 0,01$

Tabla 16 Correlación con coeficientes de Pearson entre los niveles de expresión de cada gen en la disolución 1/20 de residuo alimentario de leche.

1/20 LECHE											
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdiA</i>	ArcZ	CsrB	DsrA	OxyS	RprA	SroC
<i>adrA</i>	1	0,19	0,627**	0,642**	-0,090	-0,573*	-0,478*	-0,397	0,302	0,593**	-0,125
<i>csgD</i>		1	0,538*	0,574*	0,691**	-0,409	-0,062	-0,439	-0,519*	0,246	-0,647**
<i>hilA</i>			1	0,785**	0,279	-0,405	-0,194	-0,653**	0,254	0,656**	-0,209
<i>invA</i>				1	0,132	-0,376	-0,635**	-0,316	0,032	0,252	-0,046
<i>sdiA</i>					1	-0,306	-0,477*	-0,283	-0,387	0,284	-0,583*
ArcZ						1	0,181	-0,259	0,077	-0,343	0,717**
CsrB							1	-0,273	0,13	0,293	-0,181
DsrA								1	-0,380	-0,859**	0,292
OxyS									1	0,506*	0,487*
RprA										1	-0,224
SroC											1

* $P < 0,05$
 ** $P < 0,01$

Tabla 17 Correlación con coeficientes de Pearson entre los niveles de expresión de cada gen en el residuo alimentario de exudado de pollo.

EXUDADO DE POLLO											
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdiA</i>	ArcZ	CsrB	DsrA	OxyS	RprA	SroC
<i>adrA</i>	1	-0,110	0,472*	0,630**	0,588*	-0,244	-0,179	-0,142	0,126	0,024	0,197
<i>csgD</i>		1	0,295	-0,673**	-0,657**	-0,440	-0,536*	-0,348	0,436	0,642**	0,39
<i>hilA</i>			1	0,281	0,244	-0,343	-0,274	-0,260	0,385	0,361	0,122
<i>invA</i>				1	0,888**	0,076	0,144	-0,075	-0,169	-0,425	-0,397
<i>sdiA</i>					1	-0,053	0,181	0,232	-0,037	-0,221	-0,332
ArcZ						1	0,759**	-0,282	0,085	-0,091	-0,389
CsrB							1	-0,114	0,353	0,134	-0,411
DsrA								1	-0,448	-0,282	0,279
OxyS									1	0,937**	-0,054
RprA										1	0,151
SroC											1

* $P < 0,05$
 ** $P < 0,01$

Tabla 18 Cambio en la expresión génica de los genes y ARNs relacionados con la formación de biofilms, *quorum sensing* y virulencia, normalizada al gen de referencia 16S rRNA, en los diferentes medios y segmentados por cepas, representando la tabla a) a la cepa evaluada de *Salmonella salamae*, la b) a *S. Bardo* y la c) a *S. Enteritidis*. El cambio en la expresión génica de cada gen/ARNs está representado en cada medio de cultivo/residuo alimentario. Letras diferentes en una misma columna indica que hay diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores. Los valores que se representan como $0,0000 \pm 0,0000$ indican que no se ha detectado la expresión de dicho gen. Los valores con una desviación estándar de 0,0000 indican que solo fue posible determinar la expresión del gen/ARNs en una única medición.

a) AZ16											
MEDIO	GEN					ARNs					
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdiA</i>	ArcZ	CsrB	DsrA	OxyS	RprA	SroC
NITRITOS	-3,0769 ± 0,7871 ^d	-1,2856 ± 0,1660 ^a	-1,9296 ± 0,2290 ^c	-1,3670 ± 0,7016 ^c	-3,3766±1,2766 ^b	-1,4266 ± 0,1561 ^c	-0,4200 ± 0,0808 ^a	-1,6623 ± 0,2204 ^d	3,5433 ± 0,1316 ^b	-2,1893 ± 0,0473 ^c	-1,3310 ± 0,9358 ^{c,d}
SULFITOS	0,0126 ± 0,8965 ^b	-1,8420 ± 0,1764 ^a	-1,8520 ± 0,5252 ^c	-2,3356 ± 0,1969 ^c	-5,1230±0,000 ^b	-1,6256 ± 0,1224 ^c	-1,9380 ± 0,3108 ^b	-1,7870 ± 0,2142 ^d	0,4883 ± 0,0525 ^c	-0,9856 ± 0,0780 ^b	-1,0580 ± 0,3740 ^c
A. SÓDICO	-2,8880 ± 1,8208 ^{c,d}	-6,2180 ± 0,7839 ^b	2,4273 ± 0,1452 ^a	-2,2086 ± 1,2187 ^c	-0,4570±0,000 ^a	-4,3603 ± 0,2703 ^d	-2,6773 ± 0,0966 ^c	1,0100 ± 0,1313 ^b	6,4300 ± 0,0815 ^a	0,0956 ± 0,2483 ^a	-2,3910 ± 0,0468 ^d
1/20 LECHE	-0,0716 ± 0,6205 ^{b,c}	-2,1800 ± 0,1439 ^a	0,6573 ± 0,3055 ^b	2,7053 ± 0,2890 ^b	0,4320±0,7446 ^a	2,6156 ± 0,0873 ^a	-4,7596 ± 0,0557 ^d	2,8886 ± 0,2438 ^a	-0,2486 ± 0,2023 ^d	-0,7370 ± 0,1422 ^b	1,6810 ± 0,3009 ^b
E. POLLO	3,8296 ± 0,7866 ^a	-6,8826 ± 0,0811 ^b	1,8803 ± 0,1217 ^a	4,6873 ± 0,4315 ^a	0,2356±0,5386 ^a	1,1750 ± 0,1523 ^b	-10,7963 ± 0,0562 ^c	-0,0943 ± 0,2049 ^e	1,7940 ± 0,1897 ^c	-0,0016 ± 0,1529 ^a	4,0583 ± 0,3436 ^a

b) B2											
MEDIO	GEN					ARNs					
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdiA</i>	ArcZ	CsrB	DsrA	OxyS	RprA	SroC
NITRITOS	4,0100 ± 0,7587 ^a	-0,2646 ± 0,2256 ^a	4,1706 ± 0,3275 ^b	4,3570 ± 0,0988 ^a	4,8716 ± 0,5114 ^a	0,1336 ± 1,5931 ^a	1,8680 ± 0,1729 ^a	0,4570 ± 0,2458 ^a	5,6703 ± 0,1919 ^a	1,9913 ± 0,4827 ^b	3,5800 ± 0,6681 ^a
SULFITOS	-0,0580 ± 0,7224 ^c	-1,5786 ± 0,7260 ^b	-1,6004 ± 1,2802 ^c	-1,8006 ± 0,1295 ^d	-4,9586 ± 2,2723 ^{c,d}	-3,2485 ± 1,7090 ^a	-1,9903 ± 0,1336 ^b	-6,8136 ± 8,1194 ^a	-1,1020 ± 0,2263 ^c	-1,1106 ± 0,2178 ^d	-3,7953 ± 0,2087 ^c
A. SÓDICO	0,7366 ± 0,2260 ^{b,c}	-2,7596 ± 0,2832 ^b	1,3023 ± 0,3205 ^b	-1,5920 ± 0,4715 ^d	-5,5953 ± 1,4201 ^d	-4,6173 ± 2,8495 ^a	-2,7730 ± 0,2507 ^c	-0,6770 ± 0,3192 ^a	1,3683 ± 0,2050 ^c	-1,9490 ± 0,3383 ^d	-4,6280 ± 0,1883 ^c
1/20 LECHE	1,4520 ± 0,2524 ^b	-4,3690 ± 0,5724 ^c	1,1196 ± 0,1970 ^b	2,1993 ± 0,4522 ^b	-1,9663 ± 0,2875 ^{b,c}	0,3563 ± 1,5085 ^a	-5,4000 ± 0,1188 ^d	0,8686 ± 1,1010 ^a	0,5746 ± 0,4562 ^d	0,2733 ± 0,3824 ^c	0,6890 ± 0,2640 ^b
E. POLLO	3,9463 ± 0,2335 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^a	3,5703 ± 0,1230 ^a	0,6520 ± 0,5696 ^c	0,0000 ± 0,0000 ^b	-0,9216 ± 1,5113 ^a	-13,0803 ± 0,1207 ^c	1,3463 ± 0,1003 ^a	3,5073 ± 0,0397 ^b	3,3440 ± 0,3464 ^a	4,2866 ± 0,1677 ^a

c) ET1											
MEDIO	GEN					ARNs					
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdiA</i>	ArcZ	CsrB	DsrA	OxyS	RprA	SroC
NITRITOS	2,5366 ± 0,2532 ^a	-1,1836 ± 0,2343 ^a	2,4066 ± 0,1856 ^b	3,4043 ± 0,3954 ^a	4,5273 ± 0,2336 ^a	1,6193 ± 0,1163 ^{a,b}	0,7553 ± 0,0858 ^a	1,4826 ± 0,0499 ^c	5,1313 ± 0,1061 ^a	1,8470 ± 0,0350 ^c	3,9993 ± 0,0855 ^b
SULFITOS	1,1300 ± 0,4288 ^b	-5,1396 ± 0,2424 ^b	-0,3530 ± 0,4821 ^d	-1,0056 ± 0,2395 ^b	-4,4820 ± 1,2303 ^c	0,0450 ± 1,4203 ^b	-0,4436 ± 0,1735 ^b	2,5656 ± 0,1703 ^b	2,5720 ± 0,1924 ^c	2,2640 ± 0,0454 ^b	2,4166 ± 0,4190 ^c
A. SÓDICO	-0,1910 ± 0,1210 ^c	-7,0575 ± 0,3938 ^c	0,6790 ± 0,0632 ^c	-4,5243 ± 0,0508 ^c	-4,5886 ± 0,2767 ^c	-3,1563 ± 0,8266 ^c	-0,7560 ± 0,1591 ^b	0,3460 ± 0,0336 ^d	2,5986 ± 0,1159 ^c	0,5786 ± 0,0176 ^d	-2,4453 ± 0,1283 ^d
1/20 LECHE	-0,5916 ± 0,0771 ^c	-7,8616 ± 0,4155 ^c	-2,0930 ± 0,1550 ^c	-1,7213 ± 0,4151 ^b	-2,0980 ± 0,7364 ^b	3,2933 ± 0,0273 ^a	-2,9190 ± 0,1287 ^c	6,2413 ± 0,0985 ^a	0,9180 ± 0,1628 ^d	-0,5416 ± 0,0808 ^e	2,5503 ± 0,0260 ^c
E. POLLO	2,7683 ± 0,1610 ^a	0,0000 ± 0,0000	1,5846 ± 0,0756 ^b	-7,4550 ± 1,0964 ^d	-10,0740 ± 0,3931 ^d	0,6310 ± 0,0520 ^b	-10,8466 ± 0,1231 ^d	2,5093 ± 0,0505 ^b	3,2683 ± 0,1233 ^b	3,2690 ± 0,0905 ^a	5,2830 ± 0,0385 ^a

Tabla 19 Cambio en la expresión génica de los genes y ARNs relacionados con la formación de biofilms, *quorum sensing* y virulencia, normalizada al gen de referencia 16S rRNA, en los diferentes medios y segmentados por cepas, representando la tabla a) a la cepa evaluada de *S. Infantis*, la b) a *S. Newport* y la c) a *S. Typhimurium*. El cambio en la expresión génica de cada gen/ARNs está representado en cada medio de cultivo/residuo alimentario. Letras diferentes en una misma columna indica que hay diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores. Los valores que se representan como $0,0000 \pm 0,0000$ indican que no se ha detectado la expresión de dicho gen.

a)											
I5											
MEDIO	GEN					ARNs					
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdiA</i>	<i>ArcZ</i>	<i>CsrB</i>	<i>DsrA</i>	<i>OxyS</i>	<i>RprA</i>	<i>SroC</i>
NITRITOS	0,9680 ± 0,3066 ^b	-1,5483 ± 0,2100 ^{b,c}	1,9496 ± 2,4513 ^a	0,2770 ± 0,7369 ^{a,b}	0,5753 ± 0,1575 ^b	0,7483 ± 0,2066 ^b	0,5000 ± 0,2721 ^b	-12,5850 ± 0,0987 ^d	2,7770 ± 0,0635 ^b	0,9096 ± 0,1285 ^c	1,0393 ± 0,3950 ^c
SULFITOS	0,9986 ± 0,1206 ^b	0,3850 ± 0,1000 ^a	2,8576 ± 2,4396 ^a	1,6740 ± 0,1518 ^a	1,8036 ± 0,3244 ^a	1,7373 ± 0,0349 ^a	1,6510 ± 0,1020 ^a	-12,1253 ± 0,1557 ^c	0,7666 ± 0,1779 ^c	1,7916 ± 0,1772 ^c	1,1313 ± 0,2362 ^c
A. SÓDICO	3,1846 ± 0,1228 ^a	-3,8203 ± 1,4978 ^d	2,4546 ± 1,2301 ^a	0,1870 ± 0,9074 ^{a,b}	-1,1326 ± 0,2106 ^c	1,5203 ± 0,0795 ^a	-2,9963 ± 0,1275 ^d	-11,4680 ± 0,1375 ^b	3,7940 ± 0,0501 ^a	3,0176 ± 0,0448 ^b	3,1020 ± 0,0586 ^b
1/20 LECHE	0,4856 ± 0,1364 ^c	-2,4863 ± 0,1791 ^{c,d}	1,9190 ± 2,4838 ^a	1,0336 ± 0,9711 ^{a,b}	1,7323 ± 0,6122 ^a	1,4906 ± 0,1075 ^a	-2,3380 ± 0,0570 ^c	-10,1193 ± 0,1219 ^a	0,9356 ± 0,6923 ^c	1,3940 ± 0,1651 ^d	0,4333 ± 0,1739 ^d
E. POLLO	3,5206 ± 0,1343 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^{a,b}	2,9966 ± 2,4323 ^a	-0,5630 ± 1,0018 ^b	-5,5450 ± 0,2212 ^d	1,5726 ± 0,1105 ^a	-9,6920 ± 0,0104 ^c	-10,4346 ± 0,0874 ^a	4,6173 ± 0,1985 ^a	4,0870 ± 0,1690 ^a	3,6683 ± 0,1217 ^a
b)											
N5											
MEDIO	GEN					ARNs					
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdiA</i>	<i>ArcZ</i>	<i>CsrB</i>	<i>DsrA</i>	<i>OxyS</i>	<i>RprA</i>	<i>SroC</i>
NITRITOS	-0,5603 ± 0,2805 ^c	-3,1000 ± 0,3125 ^b	-2,8756 ± 1,1015 ^c	-2,3183 ± 0,3160 ^c	-1,5610 ± 0,2909 ^c	-0,5640 ± 0,1468 ^d	-0,3793 ± 0,1007 ^a	-0,5116 ± 0,2257 ^c	1,4566 ± 0,1358 ^d	-0,7573 ± 0,1682 ^c	-0,3943 ± 0,2060 ^c
SULFITOS	-0,0786 ± 0,5159 ^{b,c}	-2,7143 ± 0,5264 ^b	-0,1596 ± 0,1769 ^b	-1,5320 ± 1,3995 ^c	-0,8056 ± 0,4690 ^c	0,3443 ± 0,1866 ^c	-0,3130 ± 0,0759 ^a	0,7016 ± 0,2561 ^d	2,9926 ± 0,2506 ^c	1,7300 ± 0,3169 ^c	0,1580 ± 0,2201 ^{b,c}
A. SÓDICO	4,8696 ± 0,0736 ^a	0,7683 ± 0,1991 ^a	2,9956 ± 0,0620 ^a	-0,9846 ± 0,9693 ^c	1,2886 ± 0,2390 ^b	1,5113 ± 0,1515 ^a	-2,9523 ± 0,0135 ^b	2,3060 ± 0,1304 ^b	4,9350 ± 0,1694 ^a	4,4860 ± 0,0578 ^a	4,7550 ± 0,2118 ^a
1/20 LECHE	0,4923 ± 0,1901 ^b	-2,9700 ± 0,1230 ^b	0,6123 ± 0,0664 ^b	1,1693 ± 0,2280 ^b	3,4773 ± 0,2784 ^a	0,7610 ± 0,1978 ^{b,c}	-3,0460 ± 0,0287 ^b	3,0716 ± 0,1980 ^a	0,0333 ± 0,1925 ^c	0,2143 ± 0,1463 ^d	0,2853 ± 0,2579 ^b
E. POLLO	4,2036 ± 0,2013 ^a	-5,7373 ± 0,1160 ^c	2,8443 ± 0,0410 ^a	3,4913 ± 0,3038 ^a	3,9150 ± 0,5552 ^a	1,1500 ± 0,1821 ^{a,b}	-8,3593 ± 0,1609 ^c	1,5056 ± 0,1515 ^c	4,3460 ± 0,1414 ^b	3,7140 ± 0,1610 ^b	4,3306 ± 0,2387 ^a
c)											
T1											
MEDIO	GEN					ARNs					
	<i>adrA</i>	<i>csgD</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>	<i>sdiA</i>	<i>ArcZ</i>	<i>CsrB</i>	<i>DsrA</i>	<i>OxyS</i>	<i>RprA</i>	<i>SroC</i>
NITRITOS	-1,1116 ± 0,2215 ^c	-2,6006 ± 0,8333 ^b	-2,2713 ± 0,7713 ^c	-2,4763 ± 0,0360 ^c	-1,5536 ± 0,2574 ^b	-0,8000 ± 0,1110 ^c	-0,7776 ± 0,1715 ^b	-0,6793 ± 0,1187 ^c	-0,0516 ± 0,2150 ^c	-0,9263 ± 0,6017 ^c	-1,0393 ± 0,2013 ^d
SULFITOS	-0,5813 ± 0,4717 ^c	-0,0420 ± 0,7405 ^a	-0,8250 ± 0,3246 ^b	-1,3033 ± 0,5018 ^b	0,1023 ± 0,8529 ^a	2,7250 ± 0,3028 ^a	1,4300 ± 0,2952 ^a	2,6763 ± 0,0611 ^b	1,1663 ± 0,2391 ^b	1,1770 ± 0,2713 ^b	-0,1610 ± 0,1470 ^c
A. SÓDICO	1,1226 ± 0,1917 ^b	-1,5570 ± 0,7217 ^{a,b}	-0,6613 ± 0,0941 ^b	-3,4670 ± 0,2215 ^d	-2,1740 ± 0,1820 ^b	-0,4143 ± 0,2436 ^c	-3,3233 ± 0,2913 ^c	0,1600 ± 0,1040 ^d	1,3936 ± 0,2940 ^b	1,0073 ± 0,1922 ^b	1,0496 ± 0,2466 ^b
1/20 LECHE	-0,7586 ± 0,1689 ^c	-2,7000 ± 0,6506 ^b	-1,1650 ± 0,1320 ^b	-0,8810 ± 0,1594 ^{a,b}	1,3596 ± 0,2616 ^a	1,3053 ± 0,1097 ^b	-3,0020 ± 0,1125 ^c	3,7110 ± 0,0716 ^a	-0,7880 ± 0,4286 ^c	-0,6706 ± 0,3196 ^c	-0,7120 ± 0,1717 ^{c,d}
E. POLLO	2,4873 ± 0,1795 ^a	-5,5253 ± 0,5747 ^c	1,3526 ± 0,1991 ^a	-0,5296 ± 0,2228 ^a	-1,6526 ± 0,5805 ^b	1,8140 ± 0,1508 ^b	-8,6640 ± 0,2029 ^d	2,0580 ± 0,1678 ^c	3,3543 ± 0,1769 ^a	2,4883 ± 0,2840 ^a	2,8863 ± 0,2680 ^a

4.4. CURVAS DE CRECIMIENTO

En total se evaluaron 6 medios de cultivo (TSB, 1/20 TSB, 1/20 TSB suplementado con nitritos, sulfitos y acetato sódico y 1/20 leche). En el medio de TSB y 1/20 TSB solo se midió el crecimiento hasta las 30 y 23 horas, respectivamente, por haber llegado claramente a la fase estacionaria a estas horas. Los datos de los parámetros evaluados se muestran en la Tabla 20 y las curvas de crecimiento en la Figura 10.

Tabla 20 Parámetros cinéticos obtenidos en los 6 medios de cultivos diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores. $\mu_{max.}$, tasa de crecimiento máxima; OD $_{max.}$, valores de OD máximos.

MEDIO	$\mu_{max.}$	OD $_{max.}$	T
TSB	0,1482 \pm 0,0282 ^a	1,6696 \pm 0,0362 ^a	25 h
1/20 TSB	0,0526 \pm 0,0175 ^c	0,4330 \pm 0,0911 ^d	20 h
NITRITOS	0,0340 \pm 0,0092 ^c	0,8579 \pm 0,0920 ^c	30 h
SULFITOS	0,0441 \pm 0,0268 ^c	1,0374 \pm 0,0959 ^b	30 h
A. SÓDICO	0,0352 \pm 0,0104 ^c	0,8686 \pm 0,1183 ^c	54 h
1/20 LECHE	0,0885 \pm 0,0126 ^b	0,3842 \pm 0,0873 ^d	49 h

Los dos medios de cultivo con conservantes “clásicos” siguieron la misma tendencia en las curvas de crecimiento y no hubo diferencias significativas ($P = 0,05$) en cuanto a la tasa de crecimiento máxima, pero si hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) en la OD máxima alcanzada, siendo más elevada en el medio suplementado con sulfitos. El acetato sódico al 1% tuvo un efecto de inhibición del crecimiento en la fase exponencial, no comenzando una fase de crecimiento marcado hasta las 30 horas, pero entre las 49-54 horas igualó el crecimiento del medio suplementado con nitritos y superó el crecimiento de 1/20 TSB. En la formación de biofilms en acero inoxidable, el acetato sódico era el medio que más inhibía la formación de biofilms y esto puede ser porque solo se incubaron 48 horas y de haberlo evaluado a las 72 horas, los resultados podrían haber cambiado por completo.

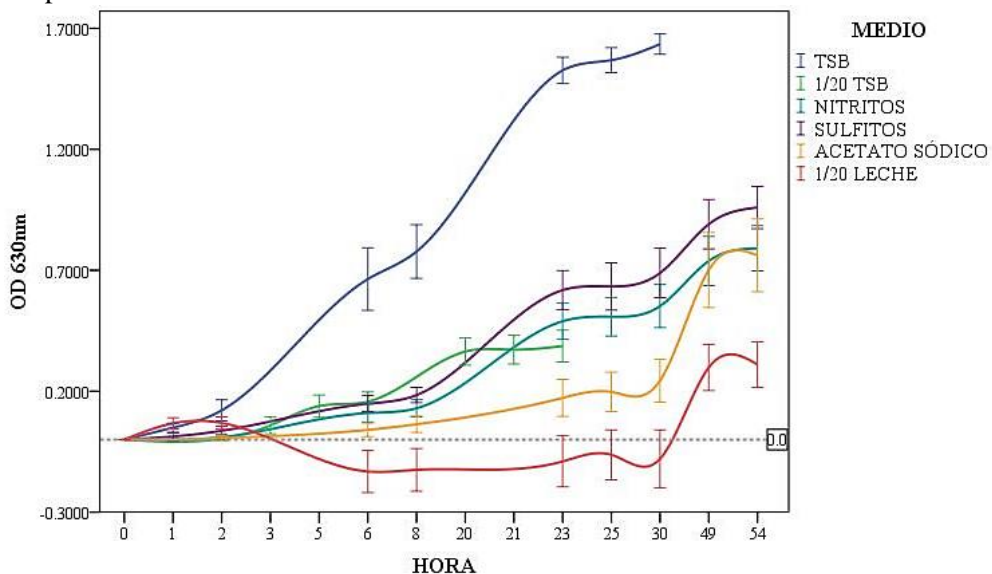


Figura 10. Curvas de crecimiento en los diferentes medios de cultivo a 22 °C. Las barras indican +/- 1 Desviación estándar.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado que la formación de biofilms varía significativamente ($P < 0,05$) dependiendo de la cepa o subespecie de *Salmonella* spp., de la temperatura y del medio de cultivo y del residuo alimentario testado. La temperatura evaluada a la que más formación de biofilms se observó fue a 22 °C, siendo ésta una temperatura de referencia para la cría de Broilers y gallinas ponedoras. Se ha observado una relación conservante alimentario/temperatura de forma que los valores más elevados de formación de biofilms se encuentran en el medio de cultivo suplementado con nitritos a 6 °C, lo que pone en peligro la efectividad antimicrobiana de este conservante en productos refrigerados. A pesar de lo esperado, la formación de biofilms sobre los residuos alimentarios fue menor que en los medios suplementados con nitritos y sulfitos. El acetato sódico en acero inoxidable inhibió la formación de biofilms por parte del 100% de las cepas evaluadas, siendo la única situación en la que no hubo formación de biofilms.
2. A 22 °C todas las cepas evaluadas mostraron el morfotipo RDAR el cual está estrechamente relacionado con la formación de biofilms. Además, a esta temperatura las cepas de *Salmonella* mostraban una elevada motilidad, lo que implica que no sólo se formarán más biofilms, sino que serán más robustos. Si bien la motilidad no difería mucho entre las temperaturas más elevadas (22, 30 y 37 °C), a la mínima temperatura testada (6 °C) era significativamente más reducida ($P < 0,05$), lo que indica que a temperatura de refrigeración los biofilms serán más fáciles de erradicar que en las otras temperaturas. A 6 °C también se reseñó un morfotipo no descrito en la bibliografía que no mostró fluorescencia en el medio suplementado con calcoflúor, lo que favorece su erradicación ya que lo que indica es que no se forman compuestos como la celulosa o las fimbrias curli que ejercen una función protectora de las células del biofilm.
3. La expresión génica de las cepas de *Salmonella* ensayadas mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) dependiendo del medio de cultivo y del residuo alimentario evaluado. Si bien *csgD* estuvo infraexpresado en todas las situaciones evaluadas, es decir, no se veía favorecida la formación de biofilms, otros genes como *adrA* que también fomenta la formación de biofilms, varió su expresión dependiendo del medio y de la cepa. Además, la expresión de los genes de virulencia también fue diferente según la cepa evaluada, de forma que se observó que en algunos medios cuando había sobreexpresión de *csgD* también había un aumento en la expresión de los genes de virulencia. En el exudado de pollo es donde más particularidades de expresión génica se observaron con respecto a otros medios de cultivo y

residuos alimentarios. OxyS en el exudado de pollo se correlaciona positivamente con *csgD* y *adrA*, a pesar de que su efecto es contrario. Convendría realizar más estudios evaluando más genes y ARNs como por ejemplo el sistema BarA/SirA, el factor σ^S o *flhDC* para poder realizar una visión más completa y comprender hasta qué punto los medios de cultivo afectan a estos reguladores. También sería interesante realizar estudios de expresión génica y formación de biofilms de *Salmonella* spp. junto con otras especies bacterianas o fúngicas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Arnold, J.W. & Yates, I.E. 2009, "Interventions for control of *Salmonella*: clearance of microbial growth from rubber picker fingers", *Poultry science*, vol. 88, no. 6, pp. 1292-1298.
2. Aviles, B., Klotz, C., Eifert, J., Williams, R. & Ponder, M. 2013, "Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system", *International journal of food microbiology*, vol. 162, no. 3, pp. 252-259.
3. Bai, A.J. & Rai, V.R. 2011, "Bacterial *Quorum Sensing* and Food Industry", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 10, no. 3, pp. 183-193.
4. Barak, J.D., Gorski, L., Naraghi-Arani, P. & Charkowski, A.O. 2005, "*Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 10, pp. 5685-5691.
5. Chia, T.W.R., McMeekin, T.A., Fegan, N. & Dykes, G.A. 2011, "Significance of the RDAR and BDAR morphotypes in the hydrophobicity and attachment to abiotic surfaces of *Salmonella* Sofia and other poultry-associated *Salmonella* serovars", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 53, no. 5, pp. 581-584.
6. Comisión Europea. 2012, "Reglamento (UE) N 200/2012 de la Comisión de 8 de marzo de 2012 relativo a un objetivo de la Unión de reducción de la *Salmonella* Enteritidis y la *Salmonella* Typhimurium en las manadas de pollos de engorde, de conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (CE) N 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo", *Diario Oficial de la Unión Europea*, vol. L 71, pp. 31-36.
7. Comisión Europea. 2011, "Reglamento (UE) N 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión", *Diario Oficial de la Unión Europea*, vol. L 295, pp. 1-177.
8. Comisión Europea. 2003, "Reglamento (CE) N 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 1 de noviembre de 2003 sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos", *Diario Oficial de la Unión Europea*, vol. L 325, pp. 1-15.
9. Cummings, P.L., Sorvillo, F. & Kuo, T. 2012, "The Burden of Salmonellosis in the United States" en *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*, ed. M. Barakat S M, InTech, pp. 1-17. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/the-burden-of-salmonellosis-in-the-united-states>. (Consultado en: marzo 2017).

10. Gibson, D.L., White, A.P., Snyder, S.D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M. & Kay, W. W. 2006, "*Salmonella* produces an O-Antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence", *Journal of Bacteriology*, vol. 188, no. 22, pp. 7722-7730.
11. Davidson, C.J., White, A.P. & Surette, M.G. 2008, "Evolutionary loss of the RDAR morphotype in *Salmonella* as a result of high mutation rates during laboratory passage", *The ISME journal*, vol. 2, no. 3, pp. 293-307.
12. De Oliveira, Débora Cristina Vidal, Fernandes Júnior, A., Kaneno, R., Silva, M.G., Araújo Júnior, J.P., Silva, N.C.C. & Rall, V.L.M. 2014, "Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material", *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 11, no. 6, pp. 478-483.
13. Díez-García, M., Capita, R. & Alonso-Calleja, C. 2012, "Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry", *Food microbiology*, vol. 31, no. 2, pp. 173-180.
14. EFSA-ECDC 2016, "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015", *EFSA Journal*, vol. 14, no. 12, pp. 231.
15. Er, B., Demirhan, B., Onurdag, F.K., Ozgacar, S.O. & Oktem, A.B. 2014, "Antimicrobial and antibiofilm effects of selected food preservatives against *Salmonella* spp. isolated from chicken samples", *Poultry science*, vol. 93, no. 3, pp. 695-701.
16. Fuentes, D.N., Calderón, P.F., Acuña, L.G., Rodas, P.I., Paredes-Sabja, D., Fuentes, J.A., Gil, F. & Calderón, I.L. 2015, "Motility modulation by the small non-coding RNA SroC in *Salmonella* Typhimurium", *FEMS microbiology letters*, vol. 362, no. 17, pp. fmv135.
17. Ghaz-Jahanian, M., Khodaparastan, F., Berenjian, A. & Jafarizadeh-Malmiri, H. 2013, "Influence of Small RNAs on Biofilm Formation Process in Bacteria", *Molecular Biotechnology*, vol. 55, no. 3, pp. 288-297.
18. Gómez-Aldapa, C.A., Torres-Vitela, M.d.R., Villarruel-López, A. & Castro-Rosas, J. 2012, "The Role of Foods in *Salmonella* Infections" en *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*, ed. M. Barakat S. M., InTech, pp. 21-46. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/the-role-of-foods-in-salmonella-infections>. (Consultado en: marzo 2017).
19. Grimont, P.A. & Weill, F. 2007, "Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars", *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, vol. 9, pp. 166.
20. Halatsi, K., Oikonomou, I., Lambiri, M., Mandilara, G., Vatopoulos, A. & Kyriacou, A. 2006, "PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdIA*", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 259, no. 2, pp. 201-207.

21. Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J. & Forsythe, S.J. 2009, "Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 136, no. 2, pp. 227-231.
22. Imen, B.S., Ridha, M. & Mahjoub, A. 2012, "Laboratory Typing Methods for Diagnostic of *Salmonella* Strains, the "Old" Organism That Continued Challenges" en *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*, ed. M. Barakat S M, InTech, pp. 349-372. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/laboratory-typing-methods-for-diagnostic-of-salmonella-strains-the-old-organism-that-continued-chall>. (Consultado en: marzo 2017).
23. Jones, B.D. 2005, "*Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness", *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, vol. 43 Spec No, pp. 110.
24. Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. & Karunasagar, I. 2001, "Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 64, no. 3, pp. 367-372.
25. Kimon A. G. Karatzas, Luke P. Randall, Mark Webber, Laura J. V. Piddock, Tom J. Humphrey, Martin J. Woodward & Nick G. Coldham 2008, "Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 5, pp. 1508-1516.
26. Kuda, T., Koyanagi, T., Shibata, G., Takahashi, H. & Kimura, B. 2016, "Effect of carrot residue on the desiccation and disinfectant resistances of food related pathogens adhered to a stainless steel surfaces", *LWT - Food Science and Technology*, vol. 74, pp. 251-254.
27. Kuda, T., Shibata, G., Takahashi, H. & Kimura, B. 2015, "Effect of quantity of food residues on resistance to desiccation of food-related pathogens adhered to a stainless steel surface", *Food Microbiology*, vol. 46, pp. 234-238.
28. Lamas, A., Fernández-No, I.C., Miranda, J.M., Vázquez, B., Cepeda, A. & Franco, C.M. 2016a, "Biofilm formation and morphotypes of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* differs from those of other *Salmonella enterica* subspecies in isolates from poultry houses", *Journal of Food Protection*, vol. 79, no. 7, pp. 1127-1134.
29. Lamas, A., Miranda, J., Vázquez, B., Cepeda, A. & Franco, C. 2016b, "An evaluation of alternatives to nitrites and sulfites to inhibit the growth of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in meat products", *Foods*, vol. 5, no. 4, pp. 74.

30. Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J., Gamazo, C., Penadés, J.R. & Lasa, I. 2005, "BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis", *Molecular Microbiology*, vol. 58, no. 5, pp. 1322-1339.
31. Ledebøer, N.A. & Jones, B.D. 2005, "Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium", *Journal of Bacteriology*, vol. 187, no. 9, pp. 3214-3226.
32. Li, J. 2016, *The effects of meat juice on biofilm formation of Campylobacter and Salmonella*, University of British Columbia.
33. Li, J., Feng, J., Ma, L., Nunez, Cesar de la Fuente, Goelz, G. & Lu, X. 2017, "Effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*", *International journal of food microbiology*, vol. 253, pp. 20-28.
34. Lianou, A. & Koutsoumanis, K.P. 2012, "Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions", *International journal of food microbiology*, vol. 160, no. 2, pp. 171-178.
35. Lin, H., Jiao, H.C., Buyse, J. & Decuypere, E. 2006, "Strategies for preventing heat stress in poultry", *World's Poultry Science Journal*, vol. 62, no. 1, pp. 71-86.
36. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method", *methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402-408.
37. M. H. Karavolos, D. M. Bulmer, K. Winzer, M. Wilson, P. Mastroeni, P. Williams & C. M. A. Khan 2008, "LuxS affects flagellar phase variation independently of *quorum sensing* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", *Journal of Bacteriology*, vol. 190, no. 2, pp. 769-771.
38. Mika, F., Busse, S., Possling, A., Berkholz, J., Tschowri, N., Sommerfeldt, N., Pruteanu, M. & Hengge, R. 2012, "Targeting of *csgD* by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*", *Molecular Microbiology*, vol. 84, no. 1, pp. 51-65.
39. Mika, F. & Hengge, R. 2013, "Small regulatory RNAs in the control of motility and biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella*", *International journal of molecular sciences*, vol. 14, no. 3, pp. 4560-4579.
40. Mühlig, A., Behr, J., Scherer, S. & Müller-Herbst, S. 2014, "Stress response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to acidified nitrite", *Applied and environmental microbiology*, vol. 80, no. 20, pp. 6373.
41. Müller-Herbst, S., Wüstner, S., Kabisch, J., Pichner, R. & Scherer, S. 2016, "Acidified nitrite inhibits proliferation of *Listeria monocytogenes* — Transcriptional analysis of a preservation method", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 226, pp. 33-41.

42. O'Leary, D., McCabe, E.M., McCusker, M.P., Martins, M., Fanning, S. & Duffy, G. 2015, "Acid environments affect biofilm formation and gene expression in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104", *International journal of food microbiology*, vol. 206, pp. 7-16.
43. Papenfort, K. & Bassler, B.L. 2016, "*Quorum sensing* signal-response systems in Gram-negative bacteria", *Nature Reviews. Microbiology*, vol. 14, no. 9, pp. 576-588.
44. Phillips, C.A. 2016, "Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control", *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 51, no. 8, pp. 1731-1743.
45. Piras, F., Fois, F., Consolati, S.G., Mazza, R. & Mazzette, R. 2015, "Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses", *Journal of food protection*, vol. 78, no. 10, pp. 1875-1878.
46. Puttamreddy, S., Carruthers, M.D., Madsen, M.L. & Minion, C.F. 2008, "Transcriptome analysis of organisms with food safety relevance", *Foodborne pathogens and disease*, vol. 5, no. 4, pp. 517-529.
47. Rodney, M.D. & Costerton, J.W. 2002, "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms", *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, no. 2, pp. 167-193.
48. Ryan, D., Ojha, U.K., Jaiswal, S., Padhi, C. & Suar, M. 2016, "The small RNA DsrA influences the acid tolerance response and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", *Frontiers in microbiology*, vol. 7, pp. 599.
49. Salahaen, S., Jaiswal, E., Joo, J., Peng, M., Ho, R., OConnor, D., Adlerz, K., Aranda-Espinoza, J.H. & Biswas, D. 2016, "Bioactive extracts from berry byproducts on the pathogenicity of *Salmonella* Typhimurium", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 237, pp. 128-135.
50. Serrano, R. & Bañón, S. 2012, "Reducing SO₂ in fresh pork burgers by adding chitosan", *Meat science*, vol. 92, no. 4, pp. 651-658.
51. Sharma, P., Dahiya, S., Balaji, V., Kanga, A., Panda, P., Das, R., Dhanraju, A., Mendiratta, D.K., Sood, S., Das, B.K. & Kapil, A. 2016, "Typhoidal *Salmonellae*: Use of multi-locus sequence typing to determine population structure", *PLOS ONE*, vol. 11, no. 9, pp. e0162530.
52. Simm, R., Ahmad, I., Rhen, M., Le Guyon, S. & Römling, U. 2014, "Regulation of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", *Future Microbiology*, vol. 9, no. 11, pp. 1261-1282.
53. Solano, C., Sesma, B., Álvarez, M., Urdaneta, E., García-Ros, D. & Calvo, A. 2001, "Virulent strains of *Salmonella* Enteritidis disrupt the epithelial barrier of Caco-2 and HEP-2 cells", *Archives of microbiology*, vol. 175, no. 1, pp. 46-51.

54. Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, Sigrid C J 2012, "Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication", *Food Research International*, vol. 45, no. 2, pp. 502-531.
55. Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L. & Suvabić-Vlahović, M. 2004, "Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 38, no. 5, pp. 428-432.
56. Su Hwa Lee, Byeong Yeal Jung, Nabin Rayamahji, Hee Soo Lee, Woo Jin Jeon, Kang Seuk Choi, Chang Hee Kweon & Han Sang Yoo 2009, "A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats", *Journal of Veterinary Science*, vol. 10, no. 1, pp. 43-51.
57. Sutherland, I.W. 1969, "Structural studies on colanic acid, the common exopolysaccharide found in the *Enterobacteriaceae*, by partial acid hydrolysis. Oligosaccharides from colanic acid", *The Biochemical journal*, vol. 115, no. 5, pp. 935-945.
58. Teplitski, M., Al-Agely, A. & Ahmer, B.M.M. 2006, "Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", *Microbiology*, vol. 152, no. 11, pp. 3411-3424.
59. Vogel, J. 2009, "A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*", *Molecular Microbiology*, vol. 71, no. 1, pp. 1.
60. Wolska, K.I., Grudniak, A.M., Rudnicka, Z. & Markowska, K. 2016, "Genetic control of bacterial biofilms", *Journal of Applied Genetics*, vol. 57, no. 2, pp. 225-238.
61. Wood, T., González Barrios, A., Herzberg, M. & Lee, J. 2006, "Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 72, no. 2, pp. 361-367.

7. ABREVIATURAS

spp.: especie // subsp.: subespecie

S.: *Salmonella*

EFSA: Autoridad de seguridad alimentaria europea

ECDC: Centro europeo de prevención y control de enfermedades.

QS: *Quorum sensing*

ARNs: Pequeño ARN // ARNm: ARN mensajero // ARNr: ARN ribosómico // npcARN: ARN no codificador de proteínas // ADNc: ADN complementario

pb.: pares de bases

c-di-GMP: bis-(3'-5')-diguanosina monofosfato cíclica

RDAR: (*Red, dry and rough*) Rojo, seco y rugoso

BDAR: (*Brown, dry and rough*) Marrón, seco y rugoso

PDAR: (*Pink, dry and rough*) Rosa, seco y rugoso

SAW: (*Smooth and white*) Suave y blanco

SBAM: (*Smooth, brown and mucoid*) Suave, marrón y mucoide

SCAW: (*Soft and completely white*) Suave y completamente blanco

TSB: (*Tryptic Soy Broth*) Caldo de triptona y soja

LB: Luria Bertrani

OD: Densidad óptica

ODc: Densidad óptica umbral

ANOVA: Análisis de varianza

AHL: Acil-Homoserina lactona

AI-2: Autoinductor - 2