

Producción de biopelículas y resistencia a desinfectantes en cepas de *Salmonella* aisladas de nopal, agua y suelo*

Biofilm production and resistance to disinfectants in *Salmonella* strains isolated from prickly pear, water and soil

Alfricia Adriana De los Santos Villamil¹, Ana María Hernández Anguiano^{1§}, Carlos Alberto Eslava Campos², Patricia Landa Salgado¹, Gustavo Mora Aguilera¹ y John Bernard Luchansky³

¹Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México- Texcoco, km 36.5. C. P. 56230. Tel 01 (595) 9520200. Ext. 1610. ²Laboratorio de Investigación Básica. Departamento de Salud Pública Facultad de Medicina- UNAM. Unidad de Posgrado 1^{er} piso. Tel. 01(555) 56220822. ³USDA/ARS/ERRC, 600 East Mermaid Lane, Wyndmoor, P. A. 19038, USA. Tel. +52(55)58045900. (avillamil@colpos.mx); (ahernandez@colpos.mx) (carlos_01eslava@yahoo.com.mx); (landa@colpos.mx) (morag@colpos.mx); (John.Luchansky@ars.usda.gov.). [§]Autora para correspondencia: ahernandez@colpos.mx.

Resumen

Una característica de *Salmonella* es su capacidad para formar biopelículas. Estas estructuras pueden convertirse en focos de contaminación en la producción de alimentos inocuos, ya que resisten tratamientos con antimicrobianos y son difíciles de remover en procedimientos normales de limpieza. Por lo anterior los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar la capacidad de cepas de *Salmonella*, aisladas de nopal verdura (10 cepas), muestras de agua (2 cepas) y suelo (3 cepas), para formar biopelículas y 2) evaluar el efecto bactericida de los desinfectantes ácido cítrico, ácido láctico e hipoclorito de sodio sobre cepas formadoras de biopelículas. Se utilizó el método de O'Toole y Kolter (1998) y placas de poliestireno (Coster[®]) con medio esencial mínimo con glucosa (MEM) y se determinó la densidad óptica (D.O) para estimar la producción de biopelículas. Los desinfectantes se aplicaron a placas con formación de biopelículas en MEM simple de 48 h a 37 °C. Todas las cepas registraron producción de biopelículas desde las 24 h aunque se obtuvieron diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$), dependiendo del tiempo de incubación con respecto a los valores de D. O. Las cepas de suelo expresaron su capacidad más rápidamente que las de agua y nopal. El hipoclorito de

Abstract

A characteristic from *Salmonella* is its capacity to form biofilms. These structures can become sources of contamination in the production of safe food, as they resist treatment with antibiotics and are difficult to remove in normal cleaning procedures. Therefore the objectives of this study were: 1) determine the capacity of *Salmonella* strains isolated from prickly pear (10 strains), water samples (2 strains) and soil (3 strains) to form biofilms and 2) evaluate the bactericidal effect of disinfectants citric acid, lactic acid and sodium hypochlorite on biofilm-forming strains. We used the method of O'Toole and Kolter (1998) and polystyrene plates (Coster[®]) with minimal essential medium with glucose (MEM) and determined the optical density (OD) to estimate the production of biofilms. The disinfectants were applied to plates with biofilm formation in simple MEM 48 h at 37 °C. All strains showed biofilm production after 24 h although there were significant differences (Tukey $\alpha=0.05$), depending on the incubation time with respect to the values of OD. The soil strains expressed its capacity faster than water and prickly pear. Sodium hypochlorite (200 ppm) and lactic acid (1.5×10^{-4}) inhibited cell growth when applied for

* Recibido: diciembre de 2011
Aceptado: septiembre de 2012

sodio (200 ppm) y el ácido láctico (1.5×10^{-4}) inhibieron el crecimiento de células cuando se aplicaron por 20 min sobre las biopelículas. Los resultados aquí obtenidos evidencian la importancia de implementar las buenas prácticas agrícolas en la producción de nopal, como estrategia para prevenir la contaminación por cepas de *Salmonella* formadoras de biopelículas *in vivo*, donde el efecto de los tratamientos con sanitizantes pudiera variar.

Palabras clave: *Salmonella*, biopelículas, desinfectantes, nopal.

Introducción

En México, el cultivo de nopal (*Opuntia ficus-indica*) ocupa una superficie promedio, a nivel nacional, de 9 318 hectáreas y como muchos otros cultivos hortofrutícolas está expuesto a contaminación por diversos microorganismos enteropatógenos, debido a las condiciones generadas durante su producción y manejo postcosecha (Hernández *et al.*, 2009). Una característica importante de estos microorganismos es su capacidad para producir biopelículas, la que les permite adherirse y colonizar superficies bióticas y abióticas como tejido vegetal y animal, plástico, cemento y acero (Hood y Zottola, 1997; Annous *et al.*, 2005; Vanegas *et al.*, 2009). Por ejemplo en cilantro por *Salmonella Thompson* (Annous *et al.*, 2009) y en melón Cantalupe por *Salmonella* sp. (Annous *et al.*, 2005), entre otros vegetales.

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

La formación de biopelículas por microorganismos representa un serio problema para los sectores industrial, de salud y de la producción de alimentos, ya que, es una fuente de contaminación microbiológica constante, debido a la dificultad para eliminarlas una vez formadas. Entre los métodos de control de las biopelículas se encuentran la utilización de desinfectantes, antibióticos, detergentes, agentes quelantes o sus combinaciones, entre otros (Scher

20 min on biofilms. The results obtained demonstrate the importance of implementing good agricultural practices in the production of prickly pear as a strategy to prevent contamination by *Salmonella* strains biofilms forming *in vivo*, where the effect of treatment with sanitizers may vary.

Key word: *Salmonella*, biofilms, disinfectant, prickly pear.

Introduction

In Mexico, the cultivation of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) covers an average area, nationwide, of 9318 hectares and as many other horticultural crops are exposed to contamination by various enteropathogenic microorganisms, due to the conditions generated during production and postharvest handling (Hernández *et al.*, 2009). An important feature of these microorganisms is its capacity to produce biofilms, which allows them to adhere and colonize biotic and abiotic surfaces such as plant and animal tissue, plastic, cement and steel (Hood and Zottola, 1997; Annous *et al.*, 2005; Vanegas *et al.*, 2009). For example: *Salmonella Thompson* in cilantro (Annous *et al.*, 2009) and *Salmonella* sp. in cantaloupe (Annous *et al.*, 2005), among other vegetables.

Biofilms are communities of microbial cells embedded in a matrix of exopolymers they produce, as a survival mechanism and protection (Branda *et al.*, 2005). The composition of this matrix is variable, can consist of carbohydrates, peptides, proteins, lipids or a combination of these substances although most of the volume is water, which accounts for up to 90% of the total content (Costerton and Rodney 2002, Lasa, 2006).

Biofilm formation by microorganisms is a serious problem for the industrial, health and food production, sector since it is a constant source of microbiological contamination due to the difficulty to remove once formed. Methods of control for biofilms are the use of disinfectants, antibiotics, detergents, chelating agents or its combination, among others (Scher *et al.*, 2005). Costerton and Rodney (2002) report that for the sanitizer to take effect on cells, it must react first with the polysaccharides of the biofilm, with the risk of oxidation when entering in contact with these compounds and lose their effectiveness (Sapers, 2003). Moreover, Kumar and Anand (1998) indicate that, after

et al., 2005). Costerton y Rodney (2002) reportan que para que el desinfectante tenga efecto sobre las células, este debe reaccionar primero con los polisacáridos de la biopelícula; con el riesgo de oxidarse al entrar en contacto con estos compuestos y perder su efectividad (Sapers, 2003). Por otra parte, Kumar y Anand (1998) indican que, después de un tratamiento con biocida, las células bacterianas pueden incrementar la producción de exopolímeros, como respuesta de defensa, dejando sin efectividad al producto.

Por lo expuesto anteriormente y debido a que durante un análisis sobre la pureza de cepas de *Salmonella* en Agar Soya Trypticaseina (AST) se observó la presencia de colonias rugosas, característica indicadora de formación de biopelículas, los objetivos de este estudio fueron evaluar la capacidad de cepas de *Salmonella* aisladas de nopal verdura fresco y muestras de agua y suelo de uso agrícola, para formar biopelículas y determinar la sensibilidad de estas a desinfectantes orgánicos e inorgánicos, con fines de prevención y control. La hipótesis es que las cepas de *Salmonella* asociadas a nopal verdura tienen la capacidad de formar biopelículas, lo que les confiere una mayor resistencia a los desinfectantes.

Metodología

Cepas bacterianas

En este estudio se analizaron 15 cepas de *Salmonella*, todas, excepto una, correspondientes a *Salmonella* entérica serotipo Typhimurium (*S. typhimurium*) y a *Salmonella* entérica serotipo Javiana (*S. javiana*), aisladas de nopal verdura (10 cepas), muestras de agua (2 cepas) y suelo de uso agrícola (3 cepas) de una zona productora de nopal en Tlalnepantla, Morelos, México, en 2006 (Cuadro 1). Como testigos se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* O44:H18 y *S. typhimurium* Copenhagen 4,12:I 12, obtenidas de una colección del Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Morfología de colonias

Las cepas individuales de *Salmonella* se desarrollaron en AST e incubaron a 37 °C por 24 h y, posteriormente, a temperatura ambiente por 38 días. Se registró el tipo

treatment with a biocide, bacterial cells can increase the production of exopolymers as defense response, leaving the product ineffective.

For the above and because during an analysis of the purity of strains of *Salmonella* in Trypticase Soy Agar (TSA) showed the presence of rough colonies, a characteristic indicator of biofilm formation, the objectives of this study were to evaluate the ability of *Salmonella* strains isolated from prickly pear and fresh water samples and soil for agricultural use, to form biofilms and to determine the sensitivity of these organic and inorganic disinfectant, for prevention and control. The hypothesis is that strains of *Salmonella* associated with prickly pear have the ability to form biofilms, which gives them greater resistance to disinfectants.

Methodology

Bacterial strains

In this study, there were examined 15 strains of *Salmonella*, all but one, for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S. typhimurium*) and *Salmonella enterica* serotype Javiana (*S. javiana*), isolated from prickly pear (10 strains), water samples (2 strains) and soil for agricultural use (3 strains) of a production area of prickly pear in Tlalnepantla, Morelos, Mexico in 2006 (Table 1). As controls were used strains of *Escherichia coli* O44:H18 and *S. typhimurium* Copenhagen. 4.12: I 12, taken from a collection of Basic Research Laboratory, from the Department of Public Health, Faculty of Medicine, of the Universidad Nacional Autónoma de México (National Autonomous University of Mexico, UNAM).

Colony morphology

Individual *Salmonella* strains were developed in TSA and incubated at 37 °C for 24 h thereafter at room temperature for 38 days. We recorded the type of growth, coloration and formation of micro channels (extracellular matrix) of the colonies. This Last is to correlate with the capacity to form biofilms *in vitro* (Malcova *et al.*, 2008).

Capacity to form biofilms

Biofilm formation was analyzed by the method of O'Toole and Kolter (1998), with some modifications. On polystyrene plates (Coster®) of 24 wells, with minimal essential medium

de crecimiento, coloración y formación de microcanales (matriz extracelular) de las colonias. Esto último para correlacionarlo con la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* (Malcova *et al.*, 2008).

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

Table 1. List of *Salmonella* strains analyzed in this study.

| Fuente | Clave cepa | Especies de <i>Salmonella</i> |
|----------------------|------------|-------------------------------|
| 1. Nopal verdura (N) | N3 | <i>Salmonella</i> sp. |
| | N4 | <i>S. javiana</i> |
| | N7 | <i>S. typhimurium</i> |
| | N8 | <i>S. javiana</i> |
| | N10 | <i>S. javiana</i> |
| | N12 | <i>S. typhimurium</i> |
| | N13 | <i>S. typhimurium</i> |
| | N14 | <i>S. javiana</i> |
| | N17 | <i>S. typhimurium</i> |
| | N18 | <i>S. typhimurium</i> |
| 2. Agua (A) | A3 | <i>S. typhimurium</i> |
| | A8 | <i>S. typhimurium</i> |
| 3. Suelo (S) | S1 | <i>S. javiana</i> |
| | S4 | <i>S. javiana</i> |
| | S8 | <i>S. javiana</i> |

Fuente: Hernández *et al.*, 2009.

Capacidad para formar biopelículas

La formación de biopelículas se analizó por el método de O'Toole y Kolter (1998), con algunas modificaciones. En placas de poliestireno (Coster®) de 24 pozos, con medio esencial mínimo con glucosa, se depositaron 50 µL de suspensión bacteriana ajustada a una densidad de 1 en la escala de McFarland (3×10^8 UFC/mL) en solución salina a 0.85%. Después de incubarse a 37 °C por 24, 48 y 72 h, se retiró la suspensión y los pozos se lavaron enérgicamente con agua destilada estéril (el lavado se repitió dos veces). A cada pozo se le agregaron 950 µL de cristal violeta a 1% y después de 20 min de reposo se eliminó el colorante y se lavó con agua destilada estéril. Se agregó 1.0 mL de etanol al 96% por pozo y el sobrenadante se transfirió a una celda para medir la densidad óptica (D. O), a 570 nm en un espectrofotómetro Spectronic® (Genesys 2). La prueba se repitió tres veces, cada una con dos repeticiones.

La D. O registrada se tomó como referencia para clasificar las cepas en las categorías de: no productora de biopelícula y productora de biopelícula (débil, moderada o fuerte)

with glucose, were placed 50 µL of bacterial suspension adjusted to a density of 1 on the McFarland scale (3×10^8 CFU / mL) in saline solution to 0.85 %. After incubating at 37 °C for 24, 48 and 72 h, the suspension was removed and the wells were washed thoroughly with sterile distilled water (washing was repeated twice). To each well were added to 950 µL of 1% crystal violet and after 20 min rest dye was removed and washed with sterile distilled water. Was added 1 mL of 96% ethanol per well and the supernatant was transferred to a cell for measuring the optical density (OD) at 570 nm in a Spectronic® spectrophotometer (Genesys 2). The test was repeated three times, each with two replicates.

The OD recorded was taken as reference to classify the strains in the following categories: no biofilm production and biofilm production (weak, moderate or strong) (Stepanovic *et al.*, 2004). For this, we defined the limit of OD (OD_L), which was established as three times the standard deviation above the mean of the negative control (*S. typhimurium* Copenhagen 4.12: I 12). Thus, the strains were categorized as follows:

$OD \leq OD_L$ = no biofilm producer (0)

$OD_L < OD \leq (2 \times OD_L)$ = weak biofilm producer (+)

$(2 \times OD_L) < OD \leq (4 \times OD_L)$ = moderate biofilm producer (++)

$(4 \times OD_L) < OD$ = strong biofilm producer (+++)

Sensitivity of *Salmonella* biofilms to organic and inorganic disinfectants

Strains selected from prickly pear were N18, A8 from water and S1 from soil for agricultural use, defined as producing strong biofilm, to determine the susceptibility of these strains to citric and lactic acids (organic), and sodium hypochlorite (inorganic), at concentrations recommended for surface disinfection of fruits and vegetables (Sapers, 2003). Lactic acid was used at 1.5×10^{-4} , citric acid to 1×10^{-4} and sodium hypochlorite at 200 ppm; as control sterile distilled water was used.

The disinfectants were applied to polystyrene plates (Coster®) with biofilm formation in simple MEM for 48 h and incubated at 37 °C. Prior to treatment, the suspension MEM was retired with a Pasteur pipette and each well was washed three times with sterile distilled water. Next, 1 mL of

(Stepanovic *et al.*, 2004). Para esto, se definió el límite de la D. O ($D. O_L$), la cual se estableció como tres veces la desviación estándar arriba de la media del testigo negativo (*S. typhimurium* Copenhagen 4,12: I 12). De esta manera, las cepas se clasificaron como sigue:

$D. O \leq D. O_L$ = no productora de biopelícula (0)

$D. O_L < D. O \leq (2 \times D. O_L)$ = productora débil de biopelícula (+)

$(2 \times D. O_L) < D. O \leq (4 \times D. O_L)$ = productora moderada de biopelícula (++)

$(4 \times D. O_L) < D. O$ = productora fuerte de biopelícula (+++)

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

Se seleccionaron las cepas N18 de nopal verdura, A8 de agua y S1 de suelo de uso agrícola, definidas como productoras fuertes de biopelículas, para conocer la sensibilidad de estas cepas a los ácidos cítrico y láctico (orgánicos), así como al hipoclorito de sodio (inorgánico), a las concentraciones recomendadas para la desinfección superficial de frutas y hortalizas frescas (Sapers, 2003). El ácido láctico se utilizó a 1.5×10^{-4} , el ácido cítrico a 1×10^{-4} y el hipoclorito de sodio a 200 ppm; como control se utilizó agua destilada estéril.

Los desinfectantes se aplicaron a placas de poliestireno (Coster®) con formación de biopelículas en MEN simple de 48 h e incubadas a 37 °C. Previo al tratamiento, la suspensión MEN se retiró con una pipeta Pasteur y cada pozo se lavó tres veces con agua destilada estéril. Enseguida, se depositó 1 mL de desinfectante por pozo y se dejó reposar por 20 min. Transcurrido ese tiempo, se retiró el desinfectante con una pipeta Pasteur y cada pozo se enjuagó con agua destilada estéril.

Para recuperar y cuantificar las células viables, en cada pozo se depositó 1 mL de CST y se incubó a 37 °C, por 24 h, sin agitación en oscuridad. Transcurrida la incubación, se tomaron 100 μ L de cada suspensión bacteriana y se depositaron en tubos Eppendorf (1 mL) con 900 μ L de agua peptonada amortiguada (DIFCO™) a 0.1%, previamente esterilizados. Después de agitarse, se tomaron 100 μ L para hacer diluciones seriadas (de 10^{-1} a 10^{-6}). De cada dilución se tomaron muestras y se sembraron en cajas Petri con AST, por la técnica de la gota (Pérez *et al.*, 2002), y

desinfectante was deposited per well and left to rest for 20 min. After this time, the disinfectant was removed with a Pasteur pipette and each well was rinsed with sterile distilled water.

To recover and quantifying viable cells in each well was placed 1 mL of CST and incubated at 37 °C for 24 h without agitation in the dark. Elapsed incubation took 100 μ L of each bacterial suspension and placed in Eppendorf tubes (1 mL) with 900 μ L of buffered peptone water (DIFCO™) to 0.1% previously sterilized. After stirring, 100 μ L were taken for serial dilutions (10^{-1} to 10^{-6}). Each dilution was sampled and seeded in Petri dishes with TSA, by the technique of drop (Pérez *et al.*, 2002), and incubated at 37 °C for 18 h. there were counted only those cases with development of separate colonies under a light with microscope.

Results and discussion

Extracellular matrix formation by *Salmonella* strains

The results show the presence of different behaviors, one of which corresponds to an increase in colony shape of micro channels and another smooth without micro channels. The type of morphology with micro channel forming bacteria is related to extracellular matrix of a typical biofilm (Malcova *et al.*, 2008). The strains that showed this type of well-defined shape were A8, S8, N3, N12, N13, N17 and N18 (Figure 1). Jonas *et al.* (2007) mentioned that this type of growth characteristic may be due to the production of curly, fiber secreted by *Salmonella* that has the function of adhesion to surfaces, cell aggregation and environmental resistance. These fibrillar structures of curly together with cellulose and other polysaccharides unite to form a visible extracellular matrix (Branda *et al.*, 2005). In contrast, the morphology of the colonies of strains A3, S1, S4, N4, N7, N8, N10 and N14 were found smooth, without the micro channels characteristic of the strains which secrete exopolysaccharides (Figure 1).

The results agree with those reported by Malcova *et al.* (2008), who compared the colony morphology of *Salmonella typhimurium* with electron microscopy, absorbance measurements and ELLA (Enzyme-Linked Assay Lectinsorbent) and assessed type of morphology (micro channels) of the bacteria but in Congo red agar. These authors point out, based on their results, in the absence of production of curly and cellulose fibers, bacterial

se incubaron a 37 °C, por 18 h. Se contaron únicamente aquellas cajas con desarrollo de colonias separadas bajo una lupa con luz.

Resultados y discusión

Formación de matriz extracelular por cepas de *Salmonella*

Los resultados obtenidos muestran la presencia de diferentes comportamientos, uno de los cuales corresponde a un crecimiento de colonia con forma de microcanales y otro liso sin microcanales. El tipo de morfología con microcanales está relacionado con bacterias formadoras de una matriz extracelular típica de biopelículas (Malcova *et al.*, 2008). Las cepas que mostraron este tipo de forma bien definida fueron A8, S8, N3, N12, N13, N17 y N18 (Figura 1). Jonas *et al.* (2007) mencionan que este tipo de crecimiento característico, puede deberse a la producción de curli, fibra secretada por *Salmonella* que tiene la función de adhesión a superficies, agregación celular y resistencia ambiental. Estas estructuras fibrilares de curli, junto con celulosa y otros polisacáridos, se unen para formar una matriz extracelular visible (Branda *et al.*, 2005). En contraste, la morfología de las colonias de las cepas A3, S1, S4, N4, N7, N8, N10 y N14 se encontró lisa, sin los microcanales característicos de las cepas que secretan exopolisacáridos (Figura 1).

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Malcova y colaboradores (2008), quienes compararon la morfología de las colonias de *Salmonella typhimurium* con microscopía electrónica, mediciones de absorbancia y ELLA (por sus siglas en inglés, Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay) y evaluaron el tipo de morfología (microcanales) de la bacteria pero en medio agar rojo congo. Dichos autores señalan, con base en sus resultados, que en ausencia de producción de fibras de curli y celulosa, las células bacterianas pueden mantener su capacidad de formar biopelículas con la sobreproducción de polisacáridos capsulares (componente de biopelículas de *Salmonella*). Considerando lo anterior las ocho cepas de *Salmonella* que registraron colonias planas sin microcanales pueden también calificarse como productoras de biopelículas en AST e incubadas en condiciones ambientales por 38 días (Figura 1).

cells can maintain their capacity to form biofilms with the overproduction of capsular polysaccharides (biofilm component of *Salmonella*). Considering the earlier eight *Salmonella* strains that showed flat colonies without micro channels can also be described as producing biofilms in TSA and incubated at ambient conditions for 38 days (Figure 1).

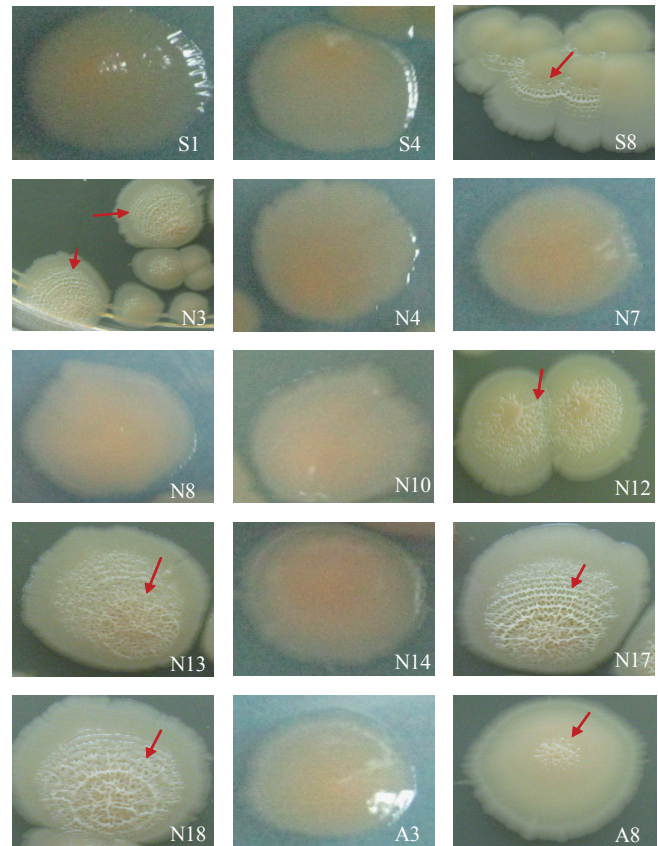


Figura 1. Comparación morfológica de colonias de *Salmonella* aisladas de nopal (N), agua (A) y suelo (S), en AST e incubadas a 37 °C por 24 h y posteriormente a temperatura ambiente por 38 días. Colonias con crecimiento tipo microcanal se indican con flecha roja.

Figure 1. Morphological comparison of isolated colonies of *Salmonella* from prickly pear (N), water (A) and ground (S), in TSA and incubated at 37 °C for 24 h thereafter at room temperature for 38 days. Micro channel-like growth colonies are indicated by red arrow.

Capacity to form biofilms

All strains of *Salmonella* tested showed ability to form biofilms after 24 h of incubation, according to the recorded values of OD at 570 nm (Table 1). However, significant differences were observed between the ability of the strains (Tukey $\alpha=0.05$), depending on the incubation times, with

Capacidad para formar biopelículas

Todas las cepas de *Salmonella* analizadas mostraron capacidad de formar biopelículas desde las 24 h de incubación, de acuerdo a los valores registrados de D.O a 570 nm (Cuadro 1). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre la capacidad de las cepas (Tukey $\alpha=0.05$), dependiendo de los tiempos de incubación, con respecto a los valores de absorbancia. Los resultados indicaron que las cepas procedentes de suelo expresan su capacidad de adhesión más rápidamente que las cepas de agua y nopal (Figura 2). Las cepas que mostraron valores de absorbancia mayores fueron el testigo positivo, con 0.694 (*E. coli* O:44 H:18), seguido por las cepas S1, S8 y S4 con 0.217, 0.188 y 0.178, respectivamente; en tanto que las cepas N13 y N17 registraron valores bajos de absorbancia, con 0.053 y 0.056, respectivamente (Cuadro 1).

Asimismo, las cepas A3 y A8, procedentes de agua, mostraron un comportamiento similar al de las cepas de suelo pero sin mostrar diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) entre sus valores (Figura 2A). Con respecto a las cepas provenientes de nopal, la cepa N8 registró el valor promedio de absorbancia más alto (0.184), seguido de las cepas N14 y N18 (0.149 y 0.161 respectivamente) (Figura 2A). En tanto que las cepas N3, N4, N7, N10, N12 y N14 registraron valores intermedios similares estadísticamente desde las 24 h. En contraste, las cepas N13 y N17 presentaron los valores de absorbancia más bajos (0.053 y 0.056, respectivamente) de todas las cepas de nopal (Figura 2A).

También se observó que la intensidad de las lecturas se incrementa con el transcurso de las horas; los valores de absorbancia más altos se registraron en 48 y 72 h. Por ejemplo, algunas cepas mostraron un aumento en los valores de densidad óptica (indirectamente, un incremento en la producción de biopelículas) con el transcurso de las horas, tal es el caso de las cepas N7 y N8, aisladas de nopal; A3 y A8, de agua; y, S1 y S4, de suelo.

Éstas cepas presentaron una fuerte producción de biopelículas desde las 24 h (Cuadro 2), no obstante, los valores más altos de absorbancia se registraron a las 72 h (Figura 2A). Scher *et al.* (2005) mencionan que *Salmonella* tiene la capacidad de formar biopelículas, independientemente de su origen (alimentos y animales, entre otros) cuya formación puede hacer resistir a la bacteria condiciones variantes del medio ambiente y constituirse en un riesgo cuando productos como el nopal se consumen frescos (Costerton y Rodney, 2002; Hernández *et al.*, 2009).

respect to the absorbance values. The results indicated that strains from soil expressed their adhesion capacity more rapidly than water and prickly pear strains (Figure 2). Strains which showed higher absorbance values were the positive control, with 0.694 (*E. coli* O:44 H:18), followed by strains S1, S8 and S4 with 0.217, 0.188 and 0.178, respectively while the strains N13 and N17 showed low values of absorbance, with 0.053 and 0.056, respectively (Table 1).

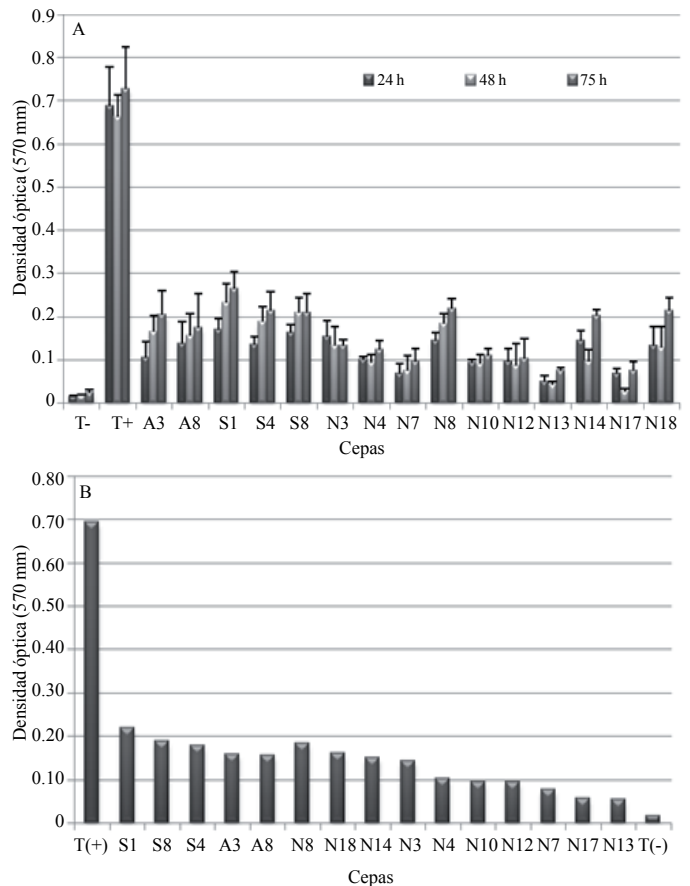


Figura 2. Valores promedio de absorbancia del sobrenadante etanólico de cepas de *Salmonella* registrados cada 24 h (A) y el promedio general de esos valores durante 72 h (B) T (-): *S. typhimurium* Copenhagen 4, 12: I 12; T (+): *E. coli* O44:H18. Las barras en A representan la desviación estándar.

Figure 2. Mean values of absorbance of the ethanolic supernatant of *Salmonella* strains recorded every 24 h (A) and the overall average of these values for 72 h (B) T (-): *S. typhimurium* Copenhagen 4, 12: I 12; T (+): *E. coli* O44: H18. The bars in A represent the standard deviation.

Furthermore, the strains A3 and A8, from water, showed a behavior similar to soil strains but no differences were significant (Tukey, $\alpha=0.05$) between their values (Figure

Cuadro 2. Valores de absorbancia de sobrenadante etanólico de cepas de *Salmonella* colectadas en Tlalnepantla, Morelos, en junio de 2006.

Table 2. Classification of strains of *Salmonella* according to their ability to produce biofilms and to form micro channels

| Cepa* | Tiempo de incubación (h) | | | Promedio |
|-----------|--------------------------|-------|-------|----------|
| | 24 | 48 | 72 | |
| Testigo - | 0.014 | 0.016 | 0.024 | 0.016 |
| Testigo + | 0.688 | 0.662 | 0.727 | 0.694 |
| A3 | 0.105 | 0.165 | 0.205 | 0.158 |
| A8 | 0.138 | 0.156 | 0.173 | 0.156 |
| S1 | 0.169 | 0.231 | 0.265 | 0.217 |
| S4 | 0.136 | 0.189 | 0.213 | 0.179 |
| S8 | 0.163 | 0.208 | 0.208 | 0.188 |
| N3 | 0.154 | 0.134 | 0.132 | 0.143 |
| N4 | 0.101 | 0.093 | 0.123 | 0.103 |
| N7 | 0.069 | 0.074 | 0.096 | 0.077 |
| N8 | 0.145 | 0.183 | 0.219 | 0.184 |
| N10 | 0.094 | 0.091 | 0.109 | 0.095 |
| N12 | 0.097 | 0.086 | 0.102 | 0.093 |
| N13 | 0.050 | 0.042 | 0.074 | 0.053 |
| N14 | 0.144 | 0.096 | 0.202 | 0.149 |
| N17 | 0.068 | 0.026 | 0.076 | 0.056 |
| N18 | 0.134 | 0.128 | 0.214 | 0.161 |

Algunas cepas de nopal, como N4, N12, N14, N17 y N18, presentaron una fuerte producción de biopelículas a las 24 h, pero esta disminuyó a las 48 h, ubicando a estas cepas dentro de la clasificación de moderadas productoras de biopelículas; no obstante, a las 72 h nuevamente registraron una fuerte producción (Figura 1A). La formación de biopelículas *in vitro* es un evento muy complejo relacionado con diferentes factores físicos y químicos, como la composición del medio, la temperatura, el pH, los niveles de oxígeno (Hostacka *et al.*, 2010), y los cambios dentro de las mismas cepas (Malcova *et al.*, 2008), entre otros. Cuadro 3.

Testigo -: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12; I 12; Testigo+: *E. coli* O44:H18. Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones.

Donde: 0, no productora; +, productora débil, ++, productora moderada; y +++, productora fuerte. La producción de microcanales se registró en AST a 37 °C

2A). With regard to strains from prickly pear N8 strain showed the average absorbance value higher (0.184), followed by strains N14 and N18 (0.149 and 0.161 respectively) (Figure 2A). While strains N3, N4, N7, N10, N12 and N14 registered statistically similar intermediate values after 24 h; in contrast, N13 and N17 strains exhibited the lowest absorbance values (0.053 and 0.056, respectively) of all strains of prickly pear (Figure 2A).

Also observed that the intensity of the reading is increased with the lapse of hours, the absorbance values was highest at 48 and 72 h. For example, some strains showed an increase in the values of optical density (indirectly, an increase in the production of biofilms) in the course of hours, as in the case of N7 and N8 strains isolated from prickly pear, A3 and A8 from water, and S1, S4 from soil.

These strains showed a strong biofilm production after 24 h (Table 2), however, higher values of absorbance were recorded at 72 h (Figure 2A). Scher *et al.* (2005) mentioned that *Salmonella* has the ability to form biofilms, regardless of their origin (food and animals, etc.) whose formation can resist bacteria varying conditions of the environment and constitute a risk when products are consumed as the prickly pear fresh (Costerton and Rodney, 2002, Hernández *et al.*, 2009).

Where: 0, no producer; +, producing weak, ++, producing moderate and +++, strong producer. Production of micro channels was recorded in TSA at 37 °C for 24 h, thereafter at room temperature for 38 days. Each value represents the average of three replicates.

Some strains of prickly pear, as N4, N12, N14, N17 and N18, showed a strong biofilm production at 24 h, but this decreased at 48 h, placing these strains within the classification of moderate biofilm producers, nevertheless, at 72 h again showed a strong production (Figura 1A). Biofilm formation *in vitro* is a complex event related to different physical and chemical factors such as medium composition, temperature, pH, oxygen levels (Hostacka *et al.*, 2010), and changes within the same strains (Malcova *et al.*, 2008) among other, Table 3.

Sensitivity of *Salmonella* biofilms to organic and inorganic disinfectants

This trial included strains A8, S1 and N18, having been recorded within the category of strong biofilm producers, from 24 h (Table 3). The results obtained with

por 24 h y posteriormente a temperatura ambiente por 38 días. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones.

Cuadro 3. Clasificación de cepas de *Salmonella* de acuerdo a su capacidad de producir biopelículas y formar microcanales.

Table 3. Absorbance values of ethanolic supernatant of *Salmonella* strains collected in Tlalnepantla, Morelos, in June 2006.

| Cepa | Tiempo de incubación (h) | | | Producción de microcanales |
|------|--------------------------|-----|-----|----------------------------|
| | 24 | 48 | 72 | |
| T- | 0 | 0 | 0 | - |
| T+ | +++ | +++ | +++ | - |
| A3 | +++ | +++ | +++ | No |
| A8 | +++ | +++ | +++ | Si |
| S1 | +++ | +++ | +++ | No |
| S4 | +++ | +++ | +++ | No |
| S8 | +++ | +++ | +++ | Si |
| N3 | +++ | +++ | +++ | Si |
| N4 | +++ | +++ | +++ | No |
| N7 | +++ | +++ | +++ | No |
| N8 | +++ | +++ | +++ | No |
| N10 | +++ | +++ | +++ | No |
| N12 | +++ | +++ | +++ | Si |
| N13 | +++ | +++ | +++ | Si |
| N14 | +++ | +++ | +++ | No |
| N17 | +++ | ++ | +++ | Si |
| N18 | +++ | +++ | +++ | Si |

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

En este ensayo se incluyeron las cepas A8, S1 y N18, por haber sido registradas dentro de la categoría de productoras fuertes de biopelículas, desde las 24 h (Cuadro 3). Los resultados obtenidos con los desinfectantes solubilizados en agua destilada muestran que solo los tratamientos con hipoclorito de sodio (200 ppm), y el ácido láctico (1.5×10^{-4} ppm) aplicados por 20 min sobre las biopelículas, inhibieron significativamente el crecimiento de las tres cepas de *Salmonella* (Figura 3). Lo anterior coincide con Joseph y colaboradores (2001) quienes reportaron que el hipoclorito de sodio a 100 ppm, aplicado por 20 min, sobre biopelículas inhibe el crecimiento de células de *Salmonella*.

El mecanismo del cloro para inhibir microorganismos puede ser el resultado de varios factores: oxidación de enzimas sulfhídrico y aminoácidos; pérdida del contenido intracelular;

the disinfectant solubilized in distilled water treatments show that only sodium hypochlorite (200 ppm), and lactic acid (1.5×10^{-4} ppm) applied for 20 min on biofilms, significantly inhibited the growth of three *Salmonella* strains (Figure 3). This coincides with Joseph and colleagues (2001) who reported that sodium hypochlorite at 100 ppm, applied for 20 min, on biofilms inhibited the growth of *Salmonella* cells.

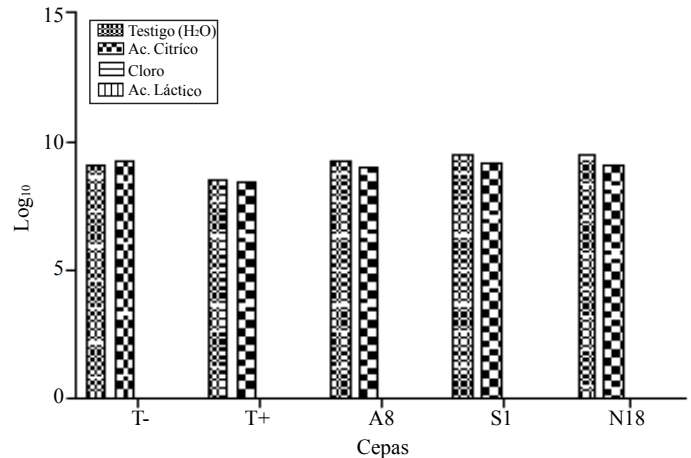


Figura 3. Efecto de desinfectantes orgánicos e inorgánicos en la viabilidad de biopelículas de cepas A8, S1 y N18 de *Salmonella* de 48 h de crecimiento a 37°C. Donde: T-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12; I: 1, 2; T+: *E. coli*.

Figure 3. Effect of organic and inorganic disinfectants on the viability of biofilms of strains A8, S1 and N18 of *Salmonella* of 48 h growth at 37 °C. Where: T-: *S. typhimurium* Copenhagen 4,12; I: 1, 2, T+ *E. coli*.

The mechanism of chlorine to inhibit microorganisms can be the result of several factors: oxidation of sulfhydryl and amino enzymes, loss of intracellular contents, decrease of nutrient uptake, inhibition of protein synthesis, decrease in oxygen uptake, oxidation of respiratory components, decreased production of adenosine triphosphate, DNA breakage and suppression of DNA synthesis (Rutala *et al.*, 2008). However, the results contrast with those obtained by Rupasinghe *et al.* (2006) who reported a decrease of 4 log, when assessing the efficacy of lactic acid (1.5%) combined with peroxyacetic acid (80 ppm) in apples inoculated with *Salmonella* Newport.

Moreover the trial with citric acid showed no inhibition of growth of adherent cells of strains A8, S1 and N18, since these remained viable, showing similar counts to those obtained with the control (Figure 3). Previously Zhuang *et al.* (1996) reported that citric acid at 0.2%, has no inhibitory effect on *Salmonella montevideo* on tomatoes.

disminución de la toma de nutrientes; inhibición de la síntesis de proteínas, decrecimiento en la toma de oxígeno; oxidación de componentes respiratorios; disminución en la producción de adenosín trifosfato, rompimiento del DNA y represión de la síntesis de DNA (Rutala, *et al.*, 2008). Sin embargo, los resultados contrastan con los obtenidos por Rupasinghe y colaboradores (2006) quienes reportaron una disminución de 4 log, cuando evaluaron la eficacia del ácido láctico (1.5%) combinado con el ácido peroxiacético (80 ppm) en manzanas inoculadas con *Salmonella* Newport.

Por otra parte el ensayo con ácido cítrico no mostró inhibición del crecimiento de las células adheridas de las cepas A8, S1 y N18, ya que estas se mantuvieron viables, mostrando cuentas similares a las obtenidas con el testigo (Figuras 3). Previamente Zhuang *et al.* (1996), reportaron que el ácido cítrico a 0.2% carece de efecto inhibitorio pero sobre *Salmonella montevideo* en tomate.

Los resultados obtenidos con los desinfectantes orgánicos e inorgánicos evidencian la importancia de implementar las buenas prácticas agrícolas en la producción de nopal verdura, como estrategia para prevenir la contaminación por cepas de *Salmonella* formadoras de biopelículas *in vivo*, donde el efecto de los tratamientos con sanitizantes pudiera variar.

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

Conclusiones

Las cepas de *Salmonella* N4, N7, N8, N10, N12, N13, N14, N17, N18, A3, A8, S1, S4 y S8, aisladas de cladodios de nopal verdura (N), agua (A) y suelo (S) de uso agrícola de la región de Tlalnepantla Morelos, tienen capacidad de formar biopelículas.

The results obtained with organic and inorganic disinfectants show the importance of implementing good agricultural practices in the production of prickly pear as a strategy to prevent contamination by *Salmonella* biofilms forming *in vivo*, where the effect of sanitizing treatments could vary.

Even when the organic acids, in this case citric acid and lactic acid, registered pH values near to (1.8 and 1.7, respectively), its inhibitory action may also depend on other factors such as the constant dissociation and its concentration (Ita and Hutkins, 1991, Buchanan *et al.*, 1993). It has been reported that lactic acid may have two possible mechanisms of antimicrobial action: one is the ability to cross the cell membrane, in this dissociation of the acid in the cell, acidified inside the same, and the other is the specific ability to reduce water activity (Rupasinghe *et al.*, 2006).

Conclusions

Salmonella strains N4, N7, N8, N10, N12, N13, N14, N17, N18, A3, A8, S1, S4 and S8, isolated from prickly pear cladodes (N), water (A) and soil (S) for agricultural use in the region of Tlalnepantla, Morelos have the ability to form biofilms.

Strains S1, S4, S8 A3 soil and water had the highest forming capacity of biofilms.

Strains S1, S4 and S8 of soil express adhesion capability faster than water strains A3 and A8 and N4, N7, N8, N10, N12, N13, N14, N17, N18 of prickly pear.

Lactic acid to 1.5×10^{-4} and sodium hypochlorite at 200 ppm, dissolved in water, significantly inhibited the growth of strains A8, S1 and N8 of *Salmonella*, when applied for 20 min to polystyrene plates with formation of biofilms of these strains.

Citric acid to 1×10^{-4} ppm had no inhibitory effect on strains A8, S1 and N8 of *Salmonella* when applied for 20 min to polystyrene plates with biofilm formation in these strains.

End of the English version



Las cepas S1, S4, S8 de suelo y A3 de agua tuvieron la mayor capacidad formativa de biopelículas.

Las cepas S1, S4 y S8 de suelo expresan su capacidad de adhesión más rápidamente que las cepas de agua A3 y A8 y que N4, N7, N8, N10, N12, N13, N14, N17, N18 de nopal.

El ácido láctico a 1.5×10^{-4} y el hipoclorito de sodio a 200 ppm, disueltos en agua, inhibieron significativamente el crecimiento de las cepas A8, S1 y N8 de *Salmonella*, cuando se aplicaron por 20 min a placas de poliestireno con formación de biopelículas de éstas cepas.

El ácido cítrico a 1×10^{-4} ppm no tuvo efecto inhibitorio sobre las cepas A8, S1 y N8 de *Samonella* cuando se aplicó por 20 min a placas de poliestireno con formación de biopelículas de estas cepas.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas (CP), por la beca número 214675 otorgada a la primera autora durante sus estudios de maestría.

Literatura citada

- Annous, B. A.; Ethan, B. S.; Cooke, P. and Burke, A. 2005. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on Cantaloupe melons. *J. Food Safety*. 25:276-287.
- Annous, A.; Smith, J. L. and Fratamico, P. M. 2009. Biofilms in fresh fruit and vegetables. *Biofilms in the food and beverage industries*. Woodhead Publishing and CRC Press. Boca Raton. 517-535 pp.
- Branda, S. S.; Vik, A. S.; Friedman, L. and Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13(1):20-26.
- Buchanan, R. L.; Golden, M. H. and Whiting, R. C. 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J. Food Protec.* 56:474-484.
- Costerton, W. and Rodney, D. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiol. Reviews* 2(15):167-193.
- Hernández, A. A.; Landa, M. P.; Mora, A. S. G.; Eslava, C. C. A.; Call, A. J. E.; Porto-F. C. S. and Luchansky, J. B. 2009. Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. Abstracts of the Annual Meeting of the International Association for Food Protection 37:74-75
- Hood, S. and Zottola, E. 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International J. Food Microbiol.* 37(3):145-153.
- Ita, P. and Hutkins, R. W. 1991. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acids. *J. Food Protec.* 54(1):15-19.
- Jonas, K.; Tomenius, H.; Kader, A.; Normark, S.; Romling, U.; Belova, L. M. and Melefors, O. 2007. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol.* 7:70.
- Hostacka, A.; Ciznar, I. and Stefkovicova C. 2010. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiol.* 55(1):75-78.
- Joseph, B.; Otta, S. K. and Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizer. *International J. Food Microbiol.* 64(3):367-372.
- Kumar, G. and Anand, P. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International J. Food Microbiol.* 42:9-27.
- Lasa, I. 2006. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International Microbiology.* 9(1):21-8.
- Malcova, M.; Hradecckar, H.; Karpiskova, R. and Rychlik. U. 2008. Biofilm formation in field strains of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium: identification of new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Veterinary Microbiol.* 129:360-366.
- O' Toole, G. and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28(3):449-461.
- Pérez, R. D.; Domínguez, V. I. y Sosa, E. 2002. Evaluación del método de siembra en placa traza de la dilución, en el control de calidad de bancos de mutantes de *Escherichia coli* K12. *Biotechnología Aplicada.* 19:169-173.

- Rupasinghe, V.; Boulter-Bitzer, J. and Odumeru, J. 2006. Lactic acid improves the efficacy of anti-microbial washing solutions for apples. *J. Food Agric. Environ.* 4(2):44-48.
- Sapers, G. M. 2003. Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruit and vegetable products. *In: Novak, J. S.; Sapers, G. M. and Juneja, V. K. (eds.). Microbial safety of minimally processed foods.* CRS PRESS. USA. 221-253 pp.
- Scher, K.; Romling, U. and Yaron, S. 2005. Effect of heat, acidification and chlorination on *Salmonella* enteric serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(3):1163-1168.
- Stepanovic, S.; Circovic, I.; Ranin, L. and Svabic-Vlahovic, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Appl. Microbiol.* 38:428-432.
- Vanegas, L.; Correa, C.; Morales, M.; Martínez, L.; Rúgeles, G. and Jiménez, I. 2009. Antibiotic resistance of bacteria isolated from biofilms in a food processing plant. *Rev. MVZ Córdoba.* 14:2.
- Zhuang, R.; Beuchat, L. R.; Chinnan, M. S. and Shewfelt, L. R. 1996. Inactivation of *Salmonella montevideo* on tomatoes by applying cellulose-based edible films. *J. Food Protec.* 59(8):808-812.