The background of the entire page is a grayscale electron micrograph showing a dense population of rod-shaped bacteria, likely Salmonella, with some smaller, more granular structures interspersed among them. The bacteria are oriented in various directions, creating a complex, textured appearance.

LIC. LINA MERINO

---

BACTERIAS LÁCTICAS Y SUS  
METABOLITOS PARA DISMINUIR LA  
FORMACIÓN DE BIOFILM DE  
*SALMONELLA* SPP. EN GRANJAS  
AVÍCOLAS

**Facultad de Ciencias Exactas**  
Universidad Nacional de La Plata

2019



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Título original del trabajo de Tesis Doctoral**

**Empleo de bacterias lácticas y sus metabolitos como estrategia de biocontrol para disminuir la incidencia de cepas de *Salmonella* spp. formadoras de biopelículas en granjas avícolas**

---

**Tesista: Lic. Lina Ethel Merino**

**Directora: Dra. Marina Golowczyc**

**Codirector: Dr. Fernando Trejo**

**Año: 2019**

El presente trabajo de tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas Área Ciencias Biológicas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CIC-CONICET; bajo la Dirección de la Dra. Marina Golowczyc y la Co-dirección del Dr. Fernando Trejo



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA



A mi madre, por ser mi guía, amiga y fiel compañera

# AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Pública de Argentina, al CONICET y a toda su comunidad por permitir desarrollar la producción pública de conocimiento. En especial a la Universidad Nacional de La Plata y a la Universidad Nacional de Hurlingham, por permitirme realizar esta tesis.

A la Dra. Graciela De Antoni, mi referente profesional, por su visión y compromiso. Eternamente agradecida por su contención.

A mis directores Marina y Fernando, por su apoyo y guía para la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de trabajo del CIDCA, en especial a Manuel, Felipe, Sabrina, Melisa, Susan, Luciana, Santiago, Agustina, Nina, Dolores, Gabriel, Florencia, Martín y Paula con quienes compartimos tantos momentos hermosos.

A mis compañeros del laboratorio de microbiología del CIDCA, y a su directora Andrea, Pablo P., Analía, Jessi, Grace, Fer, Esteban, Lucy, Mica, Pablo M., Judith, Caro, Nelson, Gabi, Fabricio y Aye, de la cátedra de Microbiología Anita, Ceci, María, Paula, Caro, Ángela, Raul, Pato, Mariana y Mariano porque la tesis es un verdadero trabajo colectivo, a todos y todas les debo parte de este trabajo.

Al grupo de investigación de la Dra. Cerquetti de la Facultad de Ciencias Médicas de la UBA, Angie, Charo y Ailín por ayudarme con gran predisposición a realizar parte de este trabajo.

A mis amigas, amigos y mis hermanos, por bancarme siempre. En especial a mi amiga Ceci por su revisión y correcciones.

A mis compañeros de lucha, por enseñarme a defender el derecho a la educación y la Universidad pública. A mis compañeros y compañeras del Programa de Extensión de Alimentos y Salud y la Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos de la Facultad de Ciencias Exactas porque construimos día a día una Universidad con compromiso social.

A Cachi, mi compañero de vida, por el amor y el aguante.

# INDICE

---

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>- 7 -</b>
<b>OBSERVACIONES PRELIMINARES</b>	<b>- 12 -</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>- 15 -</b>
1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	- 15 -
2. AGENTES MICROBIANOS CAUSANTES DE ETAS	- 17 -
3. EL GÉNERO <i>SALMONELLA</i> SPP.	- 18 -
4. PATOGÉNESIS DE <i>SALMONELLA</i>	- 18 -
5. <i>SALMONELLA</i> EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA	- 20 -
6. ADHESIÓN BACTERIANA A SUPERFICIES	- 22 -
7. BIOFILMS BACTERIANOS	- 24 -
8. MATRIZ DE LOS BIOFILMS	- 28 -
9. BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i>	- 29 -
10. IMPACTO DE LOS BIOFILMS DE <i>SALMONELLA</i> EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA	- 33 -
11. CONTROL DE LOS BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	- 35 -
11.1 ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN	- 36 -
11.2 ESTRATEGIAS DE ERRADICACIÓN	- 36 -
11.3 ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS	- 38 -
11.3.1 Enzimas	- 38 -
11.3.2 Bacteriófagos	- 38 -
11.3.3 Inhibidores de los sistemas de comunicación <i>quorum sensing</i> (QS)	- 39 -
11.3.4 Probióticos, bacterias ácido lácticas y bacteriocinas	- 39 -
11.3.5 Proteínas de superficie y metabolitos	- 42 -
12. ANTECEDENTES DEL GRUPO	- 43 -
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>- 47 -</b>
<b>CAPÍTULO 1 – CARACTERIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM POR <i>SALMONELLA</i></b>	<b>- 47 -</b>
1. MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	- 47 -
2. ESTUDIOS DE PROPIEDADES SUPERFICIALES DE <i>SALMONELLA</i>	- 48 -
2.1 Ensayos de autoagregación de <i>Salmonella</i>	- 48 -
2.2 Hidrofobicidad de las cepas de <i>Salmonella</i>	- 49 -
3. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILM EN DISTINTAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO	- 50 -
3.1 En placa de 24 pocillos	- 50 -

3.1.1 Cuantificación por tinción con cristal violeta	- 50 -
3.1.2 Cuantificación por recuento en placa	- 51 -
3.2 Sobre diferentes superficies	- 51 -
4. FORMACIÓN DE BIOFILM EN LA SUPERFICIE AIRE-LÍQUIDO EN TUBO	- 52 -
5. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE CURLI Y CELULOSA POR MORFOLOGÍA DE COLONIA EN ROJO CONGO	- 52 -
6. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR MORFOTIPO EN CALCOFLUOR	- 53 -
7. EVALUACIÓN ESTRUCTURAL DEL BIOFILM POR MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL	- 53 -
<b>CAPÍTULO 2 – CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL Y FORMACIÓN DE BIOFILM DE LACTOBACIOS</b>	<b>- 54 -</b>
1. CEPAS EMPLEADAS	- 54 -
2. ESTUDIO DE PROPIEDADES SUPERFICIALES DE LACTOBACIOS	- 55 -
2.1 Autoagregación de bacterias lácticas	- 55 -
2.2 Hidrofobicidad de bacterias lácticas	- 55 -
3. FORMACIÓN DE BIOFILM	- 55 -
3.1 Cuantificación de la formación de biofilm de lactobacilos	- 55 -
3.1.1 por cristal violeta (CV)	- 55 -
3.1.2 por recuento de viables	- 55 -
3.2 Desarrollo en diferentes condiciones de cultivo	- 56 -
3.2.1 Sobre distintas superficies	- 56 -
3.2.2 En distintos medios de cultivo	- 56 -
4. CO-AGREGACIÓN DE LACTOBACIOS CON <i>SALMONELLA</i>	- 56 -
<b>CAPÍTULO 3 - BACTERIAS LÁCTICAS Y SUS METABOLITOS SOBRE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i></b>	<b>- 57 -</b>
1. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE BIOFILM POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	- 57 -
2. EFECTO DE LOS LACTOBACIOS EN LA FORMACIÓN DE BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i>	- 57 -
2.1 Co-incubación	- 57 -
2.1.1 Por recuento	- 57 -
2.1.2 Por microscopía láser confocal	- 57 -
2.2 Pre-incubación	- 57 -
3. EFECTO DEL SOBRENADANTE LIBRE DE CÉLULAS DE LACTOBACIOS SOBRE EL BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i>	- 58 -
3.1 Obtención de sobrenadantes	- 58 -
3.2 Estudios de biofilm	- 58 -
3.2.1 Por cristal violeta	- 58 -
3.2.2 Por microscopía láser confocal	- 58 -
4. EFECTO DE LAS PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE LACTOBACIOS	- 59 -
4.1 Extracción de proteínas de superficie de lactobacilos	- 59 -
4.2 Cuantificación de las proteínas de superficie extraídas	- 59 -
4.3 Evaluación del perfil de proteínas de superficie extraídas	- 59 -
4.4 Formación de biofilm de <i>S Enteritidis</i> 115 en presencia de proteínas superficiales de lactobacilos	- 60 -
4.4.1 Pre- incubación con proteínas de superficie de lactobacilos	- 60 -
4.4.2 Co-incubación de proteínas superficiales de lactobacilos	- 60 -
5. EFECTO DE <i>LB KEFIRI</i> 8321 Y SUS METABOLITOS SOBRE EL FENOTIPO DE SE 115	- 61 -
5.1 Formación de la película en la interfaz aire- líquido	- 61 -
5.1.1 En tubo	- 61 -
5.1.2 Sobre porta objetos	- 61 -
5.2 Producción de curlis y celulosa por morfotipo en rojo congo	- 62 -
5.3 Producción de celulosa por morfotipo en calcoflúor	- 62 -
6. EFECTO DE <i>LB KEFIRI</i> NO VIABLE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CURLI Y CELULOSA DE SE 115	- 62 -

6.1 Lactobacilo tratado con calor	- 62 -
6.2 Lactobacilo tratado con UV	- 62 -
7. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO (ARNm) MEDIANTE TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL (QRT-PCR) DE GENES ASOCIADOS A LA FORMACIÓN DE BIOFILM DE SE 115 EN PRESENCIA DE <i>LB KEFIRI 8321</i>	- 63 -
<b>CAPÍTULO 4 – LACTOBACILOS Y SUS METABOLITOS SOBRE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i> EN CÁSCARA DE HUEVO</b>	<b>- 66 -</b>
1. DESINFECCIÓN DE LA SUPERFICIE DE HUEVOS	- 66 -
2. FORMACIÓN DE BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i> SOBRE CÁSCARA DE HUEVO	- 66 -
2.1 Recuento de viables	- 66 -
2.2 Observación por microscopía electrónica de barrido	- 67 -
3. EFECTO DE LOS LACTOBACILOS	- 67 -
3.1 Pre-incubación con lactobacilos	- 67 -
3.2 Co-incubación con lactobacilos	- 68 -
4. EFECTO DE LOS SOBRENADANTES DE LACTOBACILOS	- 68 -
5. EFECTO DE LAS PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE <i>LB KEFIRI 8321</i>	- 68 -
<b>ANEXO</b>	<b>- 69 -</b>
1. ENSAYOS EN CULTIVOS CELULARES	- 69 -
1.1 Células Caco- 2/TC7	- 69 -
1.1.1 Mantenimiento de las células	- 69 -
1.1.2 Tripsinado	- 70 -
1.2 Ensayo de asociación sobre células epiteliales en cultivo	- 70 -
2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE <i>SALMONELLA</i> A GENTAMICINA	- 71 -
3. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DE LOS SOBRENADANTES DE LACTOBACILOS	- 72 -
4. FORMACIÓN DE BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i> CO-INCUBADA CON <i>LB KEFIRI 8321</i> CONSERVADAS	- 72 -
4.1 Secado en spray de lactobacilos	- 72 -
4.2 liofilización de lactobacilos	- 72 -
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 73 -
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>- 76 -</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>- 77 -</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>- 79 -</b>
1. ESTUDIOS DE PROPIEDADES SUPERFICIALES DE <i>SALMONELLA</i>	- 79 -
1.1 Autoagregación	- 79 -
1.2 Hidrofobicidad	- 82 -
1.3 Relación entre la autoagregación y la hidrofobicidad superficial	- 84 -
2. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i>	- 86 -
2.1 Formación de biofilm de <i>Salmonella</i> en placa multipocillos	- 86 -
2.1.1 En diferentes condiciones de crecimiento	- 87 -
2.1.2 Formación de biofilm de <i>Salmonella</i> distintas superficies	- 94 -
2.2 Formación de película en la interfaz aire-líquido	- 97 -
2.3 Morfotipo de colonias crecidas LB con rojo Congo	- 99 -
2.4 Determinación de la producción de celulosa por morfotipo en calcoflúor	- 102 -
3. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM POR MICROSCOPIA CONFOCAL	- 103 -
4. ANÁLISIS DE CORRELACIONES	- 104 -
4.1 Propiedades superficiales y formación de biofilm	- 105 -

4.2 Relación entre formación de biofilm y características fenotípicas	- 107 -
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>- 109 -</b>

---

**CAPÍTULO 2** **- 111 -**

<b>OBJETIVOS</b>	<b>- 113 -</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>- 115 -</b>
1. CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES SUPERFICIAL DE LACTOBACILOS	- 115 -
1.1 Autoagregación	- 115 -
1.2 Hidrofobicidad	- 118 -
2. FORMACIÓN DE BIOFILM	- 119 -
2.1 Formación de biofilm de lactobacilos en distintos medios de cultivo	- 120 -
2.1.1 Cuantificación por la técnica de cristal violeta	- 120 -
2.1.2 Cuantificación por recuento de viables	- 122 -
2.2 Formación de biofilm en distintas superficies	- 125 -
3. CO-AGREGACIÓN DE LACTOBACILOS CON <i>SALMONELLA</i>	- 127 -
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>- 130 -</b>

---

**CAPÍTULO 3** **- 132 -**

<b>OBJETIVOS</b>	<b>- 133 -</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>- 135 -</b>
1. EFECTO DE LACTOBACILOS SOBRE BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i>	- 135 -
1.1 Cinética de formación de biofilm	- 136 -
1.2 Efecto de los lactobacilos en la formación de biofilm de <i>Salmonella</i>	- 137 -
1.2.1 Co-incubación	- 138 -
1.2.2 Pre-incubación	- 142 -
2. EFECTO DE LOS SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS DE LACTOBACILOS SOBRE EL BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i>	- 144 -
2.1 En presencia de sobrenadantes ácidos (SNa)	- 145 -
2.2 En presencia de sobrenadantes neutralizados (SNneu)	- 147 -
3. EFECTO DE LAS PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE LACTOBACILOS	- 150 -
3.1 Obtención de las proteínas de superficie de lactobacilos	- 150 -
3.2 Pre-incubación de las proteínas superficiales de lactobacilos	- 151 -
3.3 Co-incubación de las proteínas superficiales de lactobacilos con <i>Salmonella</i>	- 153 -
4. FENOTIPO DE SE 115 EN PRESENCIA DE <i>LB KEFIRI</i> 8321	- 156 -
4.1 Formación de película en la interfaz aire-líquido de SE 115 en presencia de <i>Lb kefir</i> 8321	- 156 -
4.2 Estudio de la presencia de <i>Lb kefir</i> 8321 en la expresión de curli y celulosa	- 157 -
4.2.1 Incubación con <i>Lb kefir</i> 8321 viable	- 157 -
4.2.2 Con <i>Lb kefir</i> 8321 no viable	- 160 -
5. EFECTO DE <i>LB KEFIRI</i> 8321 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA FORMACIÓN DE BIOFILM DE SE 115 MEDIANTE QPCR	- 161 -
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>- 165 -</b>

---

**CAPÍTULO 4** **- 167 -**

<b>OBJETIVOS</b>	<b>- 169 -</b>
------------------	----------------

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>- 171 -</b>
1. FORMACIÓN DE BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i> SOBRE LA SUPERFICIE DE LA CÁSCARA DE HUEVO	- 171 -
1.1 Por recuento en placa	- 171 -
1.2 Por microscopía electrónica de barrido	- 173 -
2. ESTUDIO DE LOS LACTOBACILOS Y SUS METABOLITOS SOBRE EL BIOFILM DE SE 115 EN CÁSCARA DE HUEVO	- 175 -
2.1 Efecto de lactobacilos	- 176 -
2.2 Efecto de sobrenadantes de lactobacilos en el biofilm de SE 115	- 180 -
2.3 Efecto de las proteínas de superficie de <i>Lb kefir</i> 8321	- 184 -
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>- 187 -</b>
<b>ANEXO</b>	<b>- 189 -</b>
1. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A GENTAMICINA	- 189 -
2. ADHESIÓN SOBRE CÉLULAS CACO-2 TC7	- 190 -
3. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE LOS SOBRENADANTES DE LACTOBACILOS	- 193 -
4. FORMACIÓN DE BIOFILM DE <i>SALMONELLA</i> CO-INCUBADA CON <i>LB KEFIR</i> 8321 LIOFILIZADA	- 193 -
<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b>	<b>- 197 -</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>202</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>- 204 -</b>
1. MEDIOS DE CULTIVO Y <i>BUFFERS</i> EMPLEADOS	- 204 -
2. CORRIDA ELECTROFORÉTICA SDS	- 206 -
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>- 209 -</b>

# OBSERVACIONES PRELIMINARES

Los resultados del presente trabajo fueron parcialmente en las siguientes instancias:

## Publicaciones periódicas

- “Biofilm formation by *Salmonella sp.* in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies”. Merino, L., Procura, F., Trejo, F. M., Bueno, D. J., & Golowczyc, M. A. *Food Research International*, 2019, 119: 530-540.
- “*Lactobacillus* strains inhibit biofilm formation of *Salmonella sp.* isolates from poultry”. Merino, L., Trejo, F. M., De Antoni, G., & Golowczyc, M. A. *Food Research International*, 2019, 123: 258-265.

## Posters en Congresos y reuniones científicas

- “Estudio de la acción de *Lactobacillus kefir* cepa CIDCA 8321 en la formación de biopelículas de cepas de *Salmonella*”. Merino L., Trejo F., De Antoni G.L., Golowczyc M.A. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM. Rosario, Santa Fe, Argentina. Septiembre 2016.
- “Surface proteins of lactic acid bacteria interfere with the biofilm formation of *Salmonella*”. Merino L., Trejo F., De Antoni G.L., Golowczyc M.A. XII Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. Agosto 2017.
- “Biofilm producing lactic acid bacteria as an alternative to control food contaminations”. Merino L., Trejo F., De Antoni G.L., Golowczyc M.A. XII Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. Agosto 2017.
- “Lactobacilos y sus metabolitos en el control de biofilms de *Salmonella* en cáscara de huevo”. Merino L., Trejo F., Golowczyc M.A. V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos CAMA. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Septiembre 2019.

# RESUMEN

*Salmonella* representa un importante problema de salud pública mundial y es una amenaza emergente de zoonosis bacteriana en la industria avícola. Se estima que el 47% de los casos de salmonelosis humana tienen orígenes avícolas. Este patógeno se puede adherir y formar biofilms en diversas superficies que se encuentran en las granjas y plantas de procesamiento de alimentos lo que puede dificultar su control. Debido a la persistencia de los biofilms de *Salmonella* en los ambientes de procesamiento de alimentos luego de la limpieza y saneamiento, las estrategias de control y erradicación en la industria avícola deben ser constantemente estudiadas.

En los últimos años se ha intensificado el abordaje de investigaciones enfocadas en el control de biofilms en la industria de los alimentos. En este sentido, se plantean alternativas a los agentes químicos que presentan ciertas desventajas debido a su toxicidad y a la resistencia que presentan los patógenos formadores de biofilms. En este contexto, las bacterias lácticas se perfilan como una alternativa de gran interés para el biocontrol de microorganismos patógenos. Tanto las bacterias lácticas y sus metabolitos son Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS) y alternativas inocuas para el biocontrol de *Salmonella* en la cadena de producción avícola, evitando así los problemas de la utilización de desinfectantes químicos y antibióticos. En este trabajo se determinó la formación de biofilms por *Salmonella* mediante diversas técnicas frecuentemente utilizadas en el estudio de biopelículas y el empleo de bacterias lácticas y sus metabolitos para prevenir y/o controlar la formación de biofilms por estas bacterias patógenas en distintas condiciones de cultivo y sobre diferentes superficies comúnmente encontradas en la industria avícola. Se evaluó también la expresión de genes asociados a la formación de biofilm de *Salmonella* durante la incubación en presencia de una cepa de lactobacilo que resultó inhibidora, lo cual no ha sido previamente documentado en la bibliografía. Por último, se estudió el efecto de los lactobacilos y sus metabolitos para la inhibición de la formación de biofilm de *Salmonella* sobre la superficie de la cáscara de huevo, donde representa un problema de contaminación.

# INTRODUCCIÓN

---



# INTRODUCCIÓN

## 1. Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son aquellas producidas por el consumo de alimentos y agua contaminados por microorganismos o parásitos, o las sustancias tóxicas que ellos producen, representando un importante problema de salud mundial, siendo especialmente vulnerables los grupos de niños, embarazadas y ancianos que son menos resistentes a las enfermedades. Las ETAs se clasifican en cinco categorías: infecciones, intoxicaciones, desórdenes alimentarios metabólicos, alergias y enfermedades propias de la idiosincrasia. Las dos primeras pueden afectar a todas las personas, mientras que las otras tres están asociadas a determinados individuos de cierta población. Los agentes infecciosos alimentarios actúan principalmente a nivel del tracto gastrointestinal, especialmente el intestino delgado, ya que estos agentes son ingeridos con los alimentos. Las infecciones son causadas por la presencia de microorganismos viables en el sitio de inflamación, los cuales luego se multiplicarán. Incluyen bacterias, parásitos, virus, etc.

Los alimentos involucrados con más frecuencia en las epidemias y casos de ETAs son aquellos de origen animal. En el 48% de las epidemias ocurridas entre 1973 y 1987, donde se identificó el vehículo, los productos involucrados eran carne bovina, huevos, carne porcina, carne de aves, pescados, crustáceos, moluscos o productos lácteos (FAO/WHO).

Según un estudio realizado en Estados Unidos en 2011, se estima que 14 patógenos transmitidos por los alimentos causan 14.1 billones de dólares en costos de enfermedad y la pérdida de 61000 años ajustados por calidad de vida (QALY), siendo los responsables de más del 90% de esta carga atribuida a cinco patógenos: *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* y norovirus. En el “top ten” de la combinación patógeno-alimento se encuentra *Salmonella* en cuatro puestos asociada a la producción, las aves de corral, los huevos y las comidas complejas procesadas (sin carne y

compuestos de múltiples ingredientes) como se muestra en la Tabla 1 (Adaptado de Batz y Hoffman, 2011).

Ranking	Combinación patógeno-alimento	QALY	Costo enfermedad*	Enfermos	Hospitalizaciones	Muertes
1	<i>Campylobacter</i> -Aves de corral	9541	1257	608231	6091	55
2	<i>Toxoplasma</i> -Cerdos	4495	1219	35537	1815	134
3	<i>Listeria</i> -Fiambres	3948	1086	651	595	104
4	<i>Salmonella</i> -Aves de corral	3610	712	221045	4159	81
5	<i>Listeria</i> -Lácteos	2392	724	434	397	70
6	<i>Salmonella</i> -Procesados	3195	630	195655	3682	72
7	Norovirus-Procesados	2294	914	2494222	6696	68
8	<i>Salmonella</i> -Producción	2781	548	170264	3204	63
9	<i>Toxoplasma</i> -Carne	2541	689	20086	1026	76
10	<i>Salmonella</i> -Huevos	1878	370	115003	2164	42
<b>Total</b>		<b>36915</b>	<b>8151</b>	<b>3861128</b>	<b>29830</b>	<b>765</b>

**Figura 1. Evaluación de pérdidas económicas y el impacto en la Salud Pública de las principales combinaciones patógeno-alimento**  
 QALY (año de vida ajustado por calidad). \* U\$ Millones.

Estos datos permiten visualizar el impacto que estos patógenos tienen sobre la salud pública y las pérdidas económicas que representan las enfermedades que causan. De esta manera, mejorar la producción de alimentos resultad indispensable y debería ser la estrategia para disminuir o evitar estas situaciones.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) constituyen uno de los problemas de salud más relevantes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que se producen unos 1700 millones de episodios de diarrea por año lo que ocasiona millones de muertes en niños menores de 5 años y se calcula que del 15 al 70% de esos casos son

causados por alimentos contaminados. Entre las bacterias asociadas a estos brotes se incluyen *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, y *Cronobacter sakazakii*. Los brotes ocasionados por patógenos emergentes y reemergentes ocurridos en los últimos años ponen de manifiesto la debilidad de los programas de control de alimentos para prevenir las ETA.

Según el boletín epidemiológico de febrero de 2014, los eventos de transmisión alimentaria estudiados durante 2013, la mayor parte de los casos positivos para diarreas bacterianas se debieron a *Shigella* (n=4191) con predominio de *S. flexneri* (n=3029), seguido por *Salmonella* (n=944), con predominio *Salmonella enteritidis* (n=203), y finalmente *Escherichia coli* (n=429), donde *E. coli* enteropatógena (n=369) predomina sobre el resto.

## **2. Agentes microbianos causantes de ETAs**

Los microorganismos responsables de ETAs incluyen bacterias, virus, parásitos, sustancias químicas, tóxicos de origen vegetal, metales y sustancias tóxicas provenientes de plaguicidas, herbicidas o fertilizantes utilizados en la industria agropecuaria. Sin embargo, las principales causantes de ETAs son de origen bacteriano. Dentro de las bacterias, las más frecuentemente encontradas en infecciones alimentarias son *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium perfringens*. Otras menos frecuentes son *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus* y *Streptococcus* grupo A.

Con frecuencia, los patógenos emergentes sobreviven a los sistemas de conservación y tratamientos utilizados tradicionalmente. Aunque la refrigeración y la acidificación resultan útiles para el control de patógenos, no son suficientes para controlar algunos patógenos emergentes. Por este motivo, es necesario aplicar los sistemas de barreras múltiples en los cuales la acción sinérgica de diversos tratamientos sub-letales (tratamiento térmico, temperatura de almacenamientos, pH, aditivos, potencial redox, microorganismos competidores) permiten la obtención de alimentos seguros.

Debe tenerse en cuenta además la tendencia de estos microorganismos para formar biopelículas o biofilms. Los microorganismos en biofilms constituyen comunidades complejas embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares por ellos producida, que permite su adhesión tanto a superficies inertes como vivas, confiriendo a esta forma de vida una buena protección frente al uso de desinfectantes y agentes microbianos (Flemming y Wingender, 2010).

### **3. El género *Salmonella* spp.**

El género *Salmonella* spp. incluye a bacilos gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* Orden Enterobacteriales, Clase Gamma-Proteobacteria (Garrity *et al.*, 2004) que contiene dos especies, *S. enterica* y *S. bongori* (Brenner *et al.*, 2000). *S. enterica* se divide en seis subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) conociéndose actualmente más de 2600 serovariedades (Imen *et al.*, 2012). La mayoría de las *Salmonellae* que causan enfermedades, con algunas importantes excepciones, son las pertenecientes a *Salmonella enterica* subespecie *enterica*. Los agentes que causan la fiebre entérica son *Salmonella entérica* subespecie *enterica* serovar Typhi y serovar Paratyphi A, B y C. Son anaerobios facultativos, no esporulados y no poseen cápsula. Son bacterias quimioorganotróficas, capaces de metabolizar la glucosa con producción de ácido o ácido y gas mediante los procesos de oxidación y fermentación, son catalasa positivos y oxidasa negativos, reducen el nitrato a nitrito y tienen un contenido de G+C del 39-59% (Bergey's, 2005). Algunos miembros de este género son móviles debido a flagelos peritricos a excepción de *Salmonella Gallinarum* y *Pullorum* que son no móviles.

### **4. Patogénesis de *Salmonella***

Miembros del género *Salmonella* son zoonóticos y pueden causar enfermedades en humanos y animales. Según la OMS, la dosis infectiva o cantidad necesaria para causar una respuesta clínica de la enfermedad en seres humanos adultos es relativamente baja

en *Salmonella* siendo de  $10^4$  a  $10^9$  para *Salmonella* Typhi y de  $10^5$  a  $10^9$  para especies de *Salmonella* no Typhi por gramo, dependiendo del alimento en el que se encuentre. Se ha encontrado en algunos casos que de 1 a 10 bacterias pueden constituir una dosis infecciosa humana (D'Aoust *et al.*, 1991, Kapperud *et al.*, 1990).

La patogenicidad de *Salmonella enteritidis* es atribuida principalmente a su capacidad para invadir células no fagocíticas, sobrevivir y crecer dentro de macrófagos y células dendríticas (Gal-Mor *et al.*, 2014). En el intestino delgado, las bacterias se adhieren a las células mucosas, células cilíndricas del epitelio intestinal (enterocitos) y células M especializadas que recubren las placas de Peyer. Si resisten la competencia con la microflora normal por los sitios de fijación y evaden a acción de la inmunoglobulina A, invaden los enterocitos y células M desencadenado por la transducción de señales dependiente de energía. Se desencadenan entonces dos eventos intracelulares: la entrada de  $Ca^{+2}$  y una nueva disposición del esqueleto de las células hospedadoras. Esto produce la formación de una evaginación de la membrana alrededor de las bacterias adherentes provocando la captación pinocítica del patógeno (Jones, 1997).

Las bacterias dentro de las células se encuentran en vesículas endocíticas donde comienzan su replicación luego de unas horas de la invasión. Estas vacuolas se translocan desde el polo apical de las células hospedadoras hasta el basal donde son liberadas dentro de la lámina propia (Isberg y Van Nhieu, 1994; Polotsky *et al.*, 1994). Luego, las bacterias translocan a los folículos intestinales linfoides y al drenaje de los ganglios linfáticos mesentéricos y algunas pasan a las células reticuloendoteliales del hígado y bazo (House *et al.*, 2001).

*Salmonella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en las células mononucleares fagocíticas de los folículos linfoides del hígado y el bazo. Luego de 7 a 14 días de incubación, el inicio de una bacteremia secundaria sostenida da como resultado una enfermedad clínica. Un factor de virulencia importante es la enterotoxina diarregénica que se libera en el citoplasma de la célula huésped, que produce la liberación de líquido hacia a luz intestinal por una secreción neta de iones  $Cl^-$  en las criptas de la mucosa intestinal y menor absorción de  $Na^+$  a nivel de las vellosidades intestinales (D'Aoust, 1991). El patrón clínico

de la salmonelosis puede dividirse en: gastroenteritis; fiebre entérica; bacteremia con o sin infección extraintestinal; y un estado asintomático.

La contaminación humana ocurre a través de la ingesta de agua y alimentos contaminados, lo que puede causar gastroenteritis o fiebre tifoidea, las cuales representan un grave problema de salud pública. Según datos de la *European Food Safety Authority* (EFSA), *Salmonella* fue el primer causante de brotes de toxoinfección alimentaria en la UE (EFSA, 2009) y posteriormente la segunda causa más común de infección gastrointestinal (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013). Las infecciones provocadas por *Salmonella* son generalmente tratadas con antibióticos, aunque la emergencia de la resistencia a antibióticos plantea la necesidad de buscar alternativas de control tales como plantas medicinales y probióticos entre otros (Doughon *et al.*, 2017).

La formación de biofilm es un mecanismo de virulencia utilizado por *Salmonella* spp. para subsistir a cambios físicos y químicos del entorno (Costerton *et al.*, 1999). Esto contribuye a su resistencia y persistencia tanto en el huésped como en otros medioambientes, especialmente en las plantas procesadoras de alimentos, pudiendo formar biofilms tanto en superficies bióticas como abióticas (Steenackers *et al.*, 2012). Su matriz extracelular está formada principalmente por celulosa, fimbrias y curli, lo que promueve la unión e interacción entre las células del biofilm (Steenackers *et al.*, 2012).

## **5. *Salmonella* en la industria avícola**

La presencia de *Salmonella* en la granja avícola tiene un gran impacto económico y genera un gran impacto en la salud pública ya que puede contaminar los productos derivados y transmitir la bacteria a los humanos. Diversos casos humanos registrados de salmonelosis han mostrado orígenes avícolas. La carne de pollo y los huevos son la mejor fuente de proteína de alta calidad y son muy necesarios para los millones de personas que viven en la pobreza (Farrell, 2013). Se estima que las aves de corral representarán la mayor parte del crecimiento de la carne consumida durante la próxima década (Conway, 2016a). Por

otro lado, la producción mundial de huevos alcanzó un hito significativo en 2015, llegando a más de 70 millones de toneladas métricas por primera vez en su historia, el equivalente a 1338 mil millones huevos. El aumento en la producción mundial de huevos entre 2000 y 2015 fue 38.7%, una tasa promedio de 2.2% por año (Conway, 2016b).

Este marcado aumento en la producción de carne y huevos de aves de corral puede verse afectado por la contaminación causada por diferentes microorganismos que y la capacidad de formación de biofilms de estos microorganismos podrían representar una fuente de persistencia en los ambientes de producción. La adhesión de *Salmonella* a las superficies de los alimentos fue el primer fenómeno reportado y publicado sobre biopelícula bacteriana transmitida por los alimentos (Duguid *et al.*, 1966).

La distribución de serotipos de *Salmonella* de fuentes avícolas varía geográficamente y cambia con el tiempo, aunque varios serotipos se encuentran consistentemente con una alta incidencia (Gast, 2013). En Europa y en Argentina se observa que tanto *Salmonella* Enteritidis (SE) como *S* Typhimurium (ST) son las serovariedades más frecuentemente asociadas con enfermedades humanas. Además, el número de casos reportados de salmonelosis en seres humanos causados por SE se va reduciendo de a poco, mientras que los producidos por ST van en paulatino aumento (Caffer *et al.*, 2010; European Food Safety Authority, 2011; Mancini, 2013). Mientras que SE es la serovariedad que más se transmite verticalmente en las aves (European Food Safety Authority, 2011), ST es la serovariedad que tiene mayor propensión a presentar multirresistencia a antibióticos (Hur *et al.*, 2012). Las salmonelosis son enfermedades complejas que con frecuencia ocasionen infecciones mixtas de varios serotipos combinados en las mismas granjas e inclusive en los mismos animales. Se ha descrito que pueden co-existir infecciones duales en las mismas granjas y ahora con técnicas moleculares modernas se ha demostrado que este fenómeno puede ocurrir con frecuencia (Pulido-Landínez *et al.*, 2014). Mientras que la prevalencia de *Salmonella entérica* en huevos comercializados en supermercados de Entre Ríos es baja (Soria, 2012), la prevalencia en algunas empresas de pollos parrilleros de país es mucho más alta, de hasta un 45% (SENASA, 2012). La contaminación con esta bacteria en carne de ave, huevos y productos avícolas puede ocurrir en múltiples etapas a lo largo de la

cadena alimentaria, que incluye producción, procesamiento, distribución, comercialización minorista, manipulación y cocción (Dookeran *et al.*, 2012). La modernización de las granjas avícolas y la globalización del comercio de aves también ha desempeñado un papel clave en la propagación de la infección (Velge *et al.*, 2005).

Los biofilms pueden jugar un papel crucial en la supervivencia de *Salmonella* en condiciones ambientales desfavorables, como granjas avícolas y mataderos de pollos (Wang *et al.*, 2013). En estudios realizados por Marin y colaboradores (2009), aproximadamente 50% de las cepas de *Salmonella* aisladas en granjas avícolas fueron capaces de producir biofilms. Las bacterias pueden formar biopelículas en los alimentos producidos, y también en áreas de procesamiento de granjas avícolas como paredes, pisos, tuberías y desagües, y en superficies de contacto, como acero inoxidable, aluminio, nylon, caucho, plástico, poliestireno y vidrio (Schonewille *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Varios agentes químicos están disponibles comercialmente para la eliminación de *Salmonella*. Sin embargo, diferentes estudios mostraron una alta prevalencia de *Salmonella* en muestras ambientales después de la limpieza y desinfección en pollos de engorde y gallineros, demostrando que la desinfección no fue efectiva contra las bacterias en una situación de campo (Davies y Breslin, 2003; Rose *et al.*, 2000).

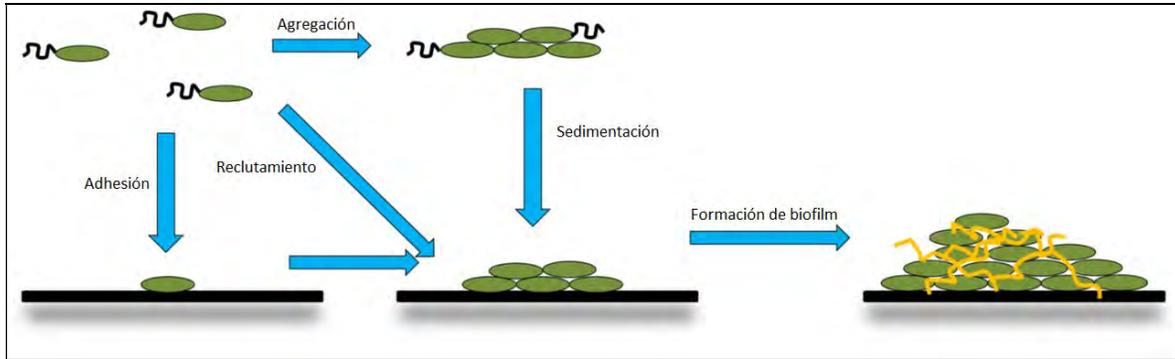
### **6. Adhesión bacteriana a superficies**

La adhesión es la unión entre una bacteria y un sustrato, cuya interacción puede ser eliminada únicamente entregando cierta cantidad de energía. Las bacterias se adhieren a sustratos mediante interacciones iónicas o Coulómbicas, a través de puentes de hidrógeno, por interacciones hidrofóbicas (Duncan-Hewitt, 1990) o por complejos de coordinación que involucre iones metálicos multivalentes.

El mecanismo de adhesión puede ser altamente estereoespecífico o no serlo, como en el caso de una bacteria cuya superficie es altamente hidrofóbica con un sustrato que también lo es (Bibiloni *et al.*, 2001). La hidrofobicidad superficial bacteriana ha sido

relacionada intensamente con la adhesión bacteriana. Se ha encontrado que las bacterias se unen preferentemente a una superficie de colonización sólida en diversos hábitats donde se encuentran sumergidas en líquido, tales como los dientes humanos o rocas sumergidas (Marshall, 1985).

Existen algunas propiedades superficiales relacionadas con la adhesión a superficies tales como la autoagregación, que se define como la capacidad de una bacteria de interactuar con otra de su misma especie en suspensión, formando cúmulos microbianos que sedimentan al fondo del tubo. Como es un fenómeno de superficie, se encuentra íntimamente relacionado con las propiedades superficiales de las bacterias (Bibiloni *et al.*, 2001; Canzi *et al.*, 2005). En este sentido, la determinación de la capacidad de autoagregación, así como la hidrofobicidad superficial, pueden ser utilizadas como un criterio preliminar en la búsqueda de bacterias capaces de adherirse a superficies (Li *et al.*, 2015). En la etapa inicial del desarrollo del biofilm se han descrito dos mecanismos mediante los cuales las células bacterianas toman contacto con dicha superficie. En uno de los mecanismos, las células planctónicas individuales se adhieren al sustrato mediante la expresión de adhesinas superficiales y posiblemente también factores de motilidad pueden estar involucrados (O'Toole y Kolter, 1998). Las bacterias así adheridas reclutan otras de la suspensión a través de autoaglutininas formando microcolonias (Beloin *et al.*, 2008). En *Salmonella*, las autoaglutininas mediadoras son las fimbrias curli (Collinson *et al.*, 1993). Además, las células individuales pueden migrar a lo largo de la superficie, por ejemplo, utilizando pili tipo IV, y luego agregar junto a otras células bacterianas (Dunne, 2002). El segundo mecanismo ocurre a partir de células que se agregan en suspensión y seguidamente se asientan en el sustrato para iniciar la formación de biofilm (Kragh *et al.*, 2016). Estos dos mecanismos pueden darse simultáneamente como se muestra en el esquema de la Figura 3 (adaptado de Trunk *et al.*, 2018).



**Figura 3. Mecanismos de adhesión inicial en la formación de biofilm.** La autoagregación se ha relacionado con las etapas iniciales de la formación de biofilms.

También se ha encontrado que las bacterias pueden agregarse en la interfaz agua-aire y agua-hidrocarburo. El interés particular que este fenómeno representa en la salud es que permite la interacción entre la superficie de la célula bacteriana y las células animales en las primeras etapas de la fagocitosis o la infección. Existe evidencia que muestra que un factor importante de este fenómeno es la interacción hidrofóbica de las superficies (Ofec *et al.*, 1983).

## 7. Biofilms bacterianos

Las bacterias pueden encontrarse creciendo en dos posibles estados: planctónico (en suspensión) o adherido a la superficie formando biofilms. Se ha reportado que el 99% de todas las células bacterianas existen en forma de biofilms mientras que sólo 1% vive en estado planctónico (Sanclement *et al.*, 2005; Radaman *et al.*, 2005), y que el 80% de todas las infecciones bacterianas están relacionadas a biofilms (Hall-Stoodley *et al.*, 2009).

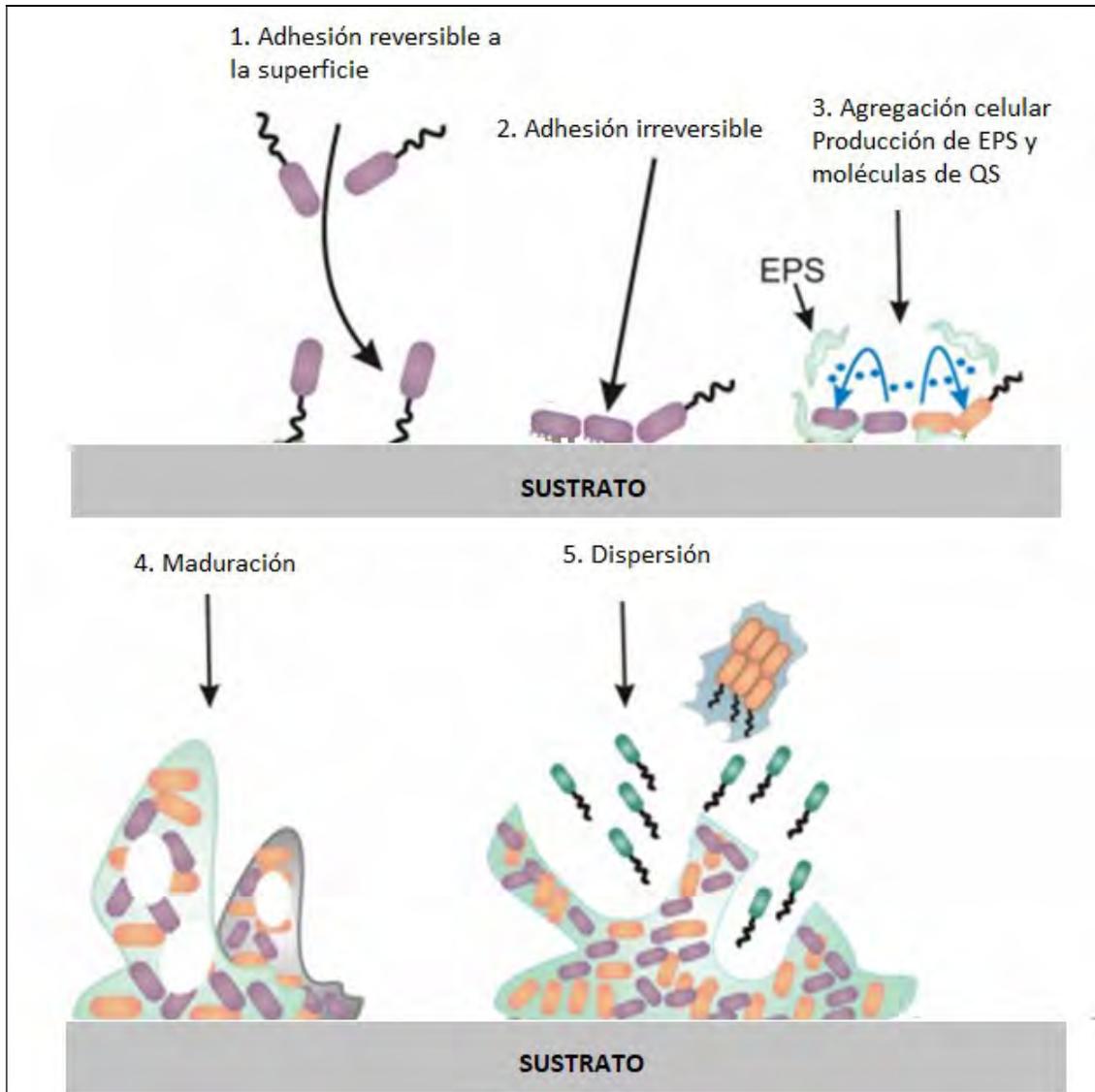
Durante la mayor parte de la historia de la microbiología, los microorganismos se han caracterizado principalmente como planctónicos, células libremente suspendidas y descritas sobre la base de sus características de crecimiento en medios de cultivo nutricionalmente ricos. Descrito por primera vez por van Leeuwenhoek, quien observó en 1674 los microorganismos de la placa dental con un microscopio, se conoce que los microorganismos se adhieren y crecen en superficies expuestas embebidas en una matriz

polimérica exhibiendo un fenotipo distintivo con respecto a la transcripción de genes y a la tasa de crecimiento a sus contrapartes planctónicas (Donlan, 2002).

Estas comunidades de microorganismos se encuentran adheridos irreversiblemente a una superficie o interfase, embebidos en una matriz extracelular compuesta principalmente de polisacáridos, pero que también poseen proteínas, ácidos nucleicos, agua y otros componentes. Las células que forman parte de estas estructuras expresan características fenotípicas particulares diferentes a sus contrapartes planctónicas.

Pueden estar constituidos por microorganismos de la misma especie, de distinta especie e incluso por diferentes géneros microbianos.

La formación de biofilm se produce en 5 etapas distinguibles como se observa en la Figura 4 (Stoodley *et al.*, 2002; Mizan *et al.*, 2015).



**Figura 4. Etapas de la formación de biofilm**

En primer lugar, algunas células pasan del estado planctónico a adherirse débilmente a la superficie. Este paso depende de las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular (Ferreira *et al.*, 2010) y de la superficie de adhesión (Van Houdt y Michiels, 2010). Para que pueda iniciarse el proceso, se ponen en juego fuerzas electrostáticas o Van der Waals. Varias estructuras de superficie bacteriana tales como las fimbrias, flagelos y polisacáridos extracelulares están involucradas en la adhesión de células bacterianas (Latasa *et al.*, 2005; Anriany *et al.*, 2006; Kim y Wei 2009; van Houdt y Michiels 2010).

En la segunda etapa, las interacciones débiles pasan de ser reversibles a irreversibles con la presencia de exopolisacárido (EPS) o ligandos específicos como pili o fimbrias formando un complejo con la superficie (Stoodley *et al.*, 2002).

La tercera etapa se caracteriza por la agregación de células en microcolonias y se da la mayor producción de EPS que une con mayor fuerza las células y el sustrato estabilizando la colonia frente a las condiciones ambientales adversas (Donlan, 2002). La acumulación de bacterias y el reclutamiento de éstas desde el medio puede deberse al mecanismo de comunicación entre células conocido como *quorum sensing*, donde la respuesta se debe a la diferente concentración de moléculas señales. A medida que la población bacteriana aumenta, también lo hace la concentración de señales y una vez alcanzada la concentración umbral, se dice que la población ha llegado al *quorum*. Esto desencadena la expresión de genes específicos tales como la producción de exopolisacáridos (Annous *et al.*, 2009).

En la cuarta etapa el biofilm madura y se desarrolla dentro de una estructura organizada que puede tener una forma achatada o tipo hongo, dependiendo de la fuente nutricional (Parsek y Tolker-Nielsen, 2008). De este modo, las bacterias crecen formando microcolonias complejas y heterogéneas con canales que permiten el intercambio de nutrientes y desechos desde y hacia el interior y el exterior de la estructura del biofilm (Flemming y Wingender, 2010).

En la última y quinta etapa, algunas células del biofilm se liberan y vuelven al estado planctónico. De esta forma pueden colonizar otros nichos o superficies (Sauer, 2002). Efectos externos, tales como fuerzas de cizalla y agotamiento de nutrientes y procesos internos dentro del biofilm tales como la degradación enzimática o liberación de EPS o proteínas de unión a superficie, provocan el desprendimiento de las células en el biofilm (McDougald *et al.*, 2012). Se observa entonces que el proceso de formación de biofilm es activo y requiere de grandes niveles de regulación.

La formación de biofilm es una estrategia que desarrollan los microorganismos para resistir a condiciones desfavorables para su desarrollo, como la presencia de antibióticos y agentes desinfectantes, cambios de pH o temperatura, el sistema inmune del huésped o

baja disponibilidad de nutrientes. Las células en biofilm tienen la capacidad de intercambiar componentes genéticos y esto puede facilitar la adquisición de nuevos genes para virulencia y supervivencia ambiental (Donlan, 2002; Giaouris *et al.*, 2015). Dentro del biofilm, la tasa de transferencia horizontal de genes es muy elevada, principalmente debido a la presencia de pili, apéndices capilares bacterianos que permiten además la adhesión a superficies y que poseen un rol estructural muy importante (Costerton, 2007).

## **8. Matriz de los biofilms**

La matriz extracelular del biofilm está formada principalmente por sustancias poliméricas extracelulares producidas por las propias bacterias, tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos, siendo el más común la celulosa, aunque también el ADN extracelular juega un importante rol en el establecimiento de la estructura (Whitchurch, 2002). Estas inmovilizan las células y las mantienen en cercana proximidad, permitiendo intensas interacciones, incluyendo la comunicación célula-célula y la conformación de microconsorcios sinérgicos. Los exopolisacáridos presentes en las bacterias se pueden ubicar en forma ordenada o desordenada según las condiciones ambientales (Lembre, 2012) y pueden interactuar con otras moléculas cumpliendo variadas funciones. Así, la interacción entre exopolisacáridos y proteínas tienen tanto un rol estructural como una función específica. Por ejemplo, algunas proteínas son enzimas y cumplen la función de un sistema digestivo externo a la célula (Wicker-Böckelmann, 1987). La presencia de EPS secretados son responsables de la adhesión, agregación y estabilidad de los biofilms y le confieren protección frente a los antimicrobianos, así como mayor elasticidad lo que aumenta la resistencia a acciones mecánicas, cambiando su forma en respuesta a la aplicación de una fuerza (Stoodley, 2002). La estabilidad de la matriz de los biofilms depende del grado de entrecruzamiento de los exopolisacáridos y las interacciones débiles entre las moléculas, tales como fuerzas electrostáticas atractivas, fuerzas repulsivas (evitan el colapso), puentes de hidrógenos, fuerzas de Van der Waals y fuerzas iónicas atractivas (Flemming, 2010).

Se han encontrado varias funciones asociadas a la matriz de los biofilms (Flemming, 2010): i) Adhesión, permitiendo los primeros pasos en la colonización de superficies bióticas y abióticas por la presencia de polisacáridos, proteínas, ADN y moléculas anfífilas en la matriz; ii) agregación de células bacterianas, es decir la unión entre ellas; iii) cohesión del biofilm formando una red polimérica hidratada que confiere estabilidad mecánica mediante compuestos neutros y cargados; iv) retención de agua manteniendo el microambiente hidratado aún en condiciones de baja humedad; v) barrera de protección confiriendo resistencia a los sistemas de defensa del huésped y tolerancia a varios agentes antimicrobianos; vi) absorción de compuestos orgánicos e iones inorgánicos; vii) actividad enzimática permitiendo la digestión de macromoléculas exógenas; viii) intercambio de información genética por transferencia horizontal; ix) donador/aceptor de electrones permitiendo reacciones redox, entre otras posibles funciones asociadas. Sin embargo, la composición de la matriz es difícil de determinar por la variedad de sus componentes y porque estos dependen de los microorganismos presentes, de las fuerzas de cizalla que se experimentan, de la temperatura y de la disponibilidad de nutrientes (Flemming, 2010).

## **9. Biofilm de *Salmonella***

Las características generales de formación de biofilm se aplican a todos los microorganismos, incluido el género *Salmonella*. Esta bacteria tiene un ciclo de vida en el cual la colonización se alterna con períodos de supervivencia fuera del huésped (Winfield *et al.*, 2003). La formación de biofilm le permite a la *Salmonella* poder sobrevivir tanto durante la colonización como en condiciones externas al huésped. De esta manera, se puede encontrar biofilm de *Salmonella* tanto en superficies abióticas (plástico, cemento, vidrio, acero inoxidable y otras) (Arnold *et al.*, 2000; Joseph *et al.*, 2001; Chia *et al.*, 2009; Stepanović *et al.*, 2004), como bióticas tales como semillas, hojas y raíces de plantas, células animales epiteliales (Ledebøer *et al.*, 2006; Misselwitz *et al.*, 2011) y cálculos biliares (Prouty y Gunn, 2003; Steenackers *et al.*, 2011).

Las estructuras más estudiadas de la matriz extracelular de los biofilms de *Salmonella* son las fimbrias curli y la celulosa. Estas estructuras son además los componentes más importantes en los morfotipos RDAR (rojo, seco y rugoso, por sus siglas en inglés) formado durante el crecimiento en placas de agar con rojo congo. Este morfotipo está relacionado con la capacidad de formación de biofilm (Römling *et al.*, 1998; Gerstel y Römling, 2003). La co-expresión de estos componentes estructurales resulta en una red hidrofóbica bien empaquetada de células en una red compacta (Zogaj *et al.*, 2001). Otros componentes importantes del proceso de formación de biofilm de *Salmonella* son otras fimbrias, BapA, flagelos, ácido colánico, la cápsula aniónica del antígeno O y ácidos grasos, los cuales varían considerablemente con las condiciones ambientales aplicadas (Steenackers *et al.*, 2012). La fracción proteica se compone mayormente de fimbrias curli adhesivas (Tafi) (Römling *et al.*, 1998), formadas por las subunidades CsgA y CsgB, las cuales son importantes para la colonización, persistencia e invasión del huésped (Barnhart y Chapman, 2006) y la proteína BapA, secretada y débilmente asociada a la superficie celular (Latasa *et al.*, 2005). La fracción polisacárida está compuesta en mayor medida por celulosa (Zogaj *et al.*, 2001) un polímero  $\beta$ -1-4-D-glucosa que da soporte a las interacciones célula-célula de largo alcance responsable de la textura pegajosa, y por cápsula antigénica O (Gibson *et al.*, 2006) y lipopolisacáridos (Anriany *et al.*, 2006). El ácido colánico contribuye a la formación de la compleja arquitectura en tres dimensiones en los biofilms de *E. coli* mientras que en *Salmonella* puede ser importante para la formación de una película compacta (Solano *et al.*, 2002).

La formación de biofilm en *Salmonella* es un proceso altamente regulado, en el cual intervienen varios sets de genes involucrados en la producción de la matriz del biofilm, la adhesión y la maduración. Esta compleja red reguladora se esquematiza en la Figura 5.

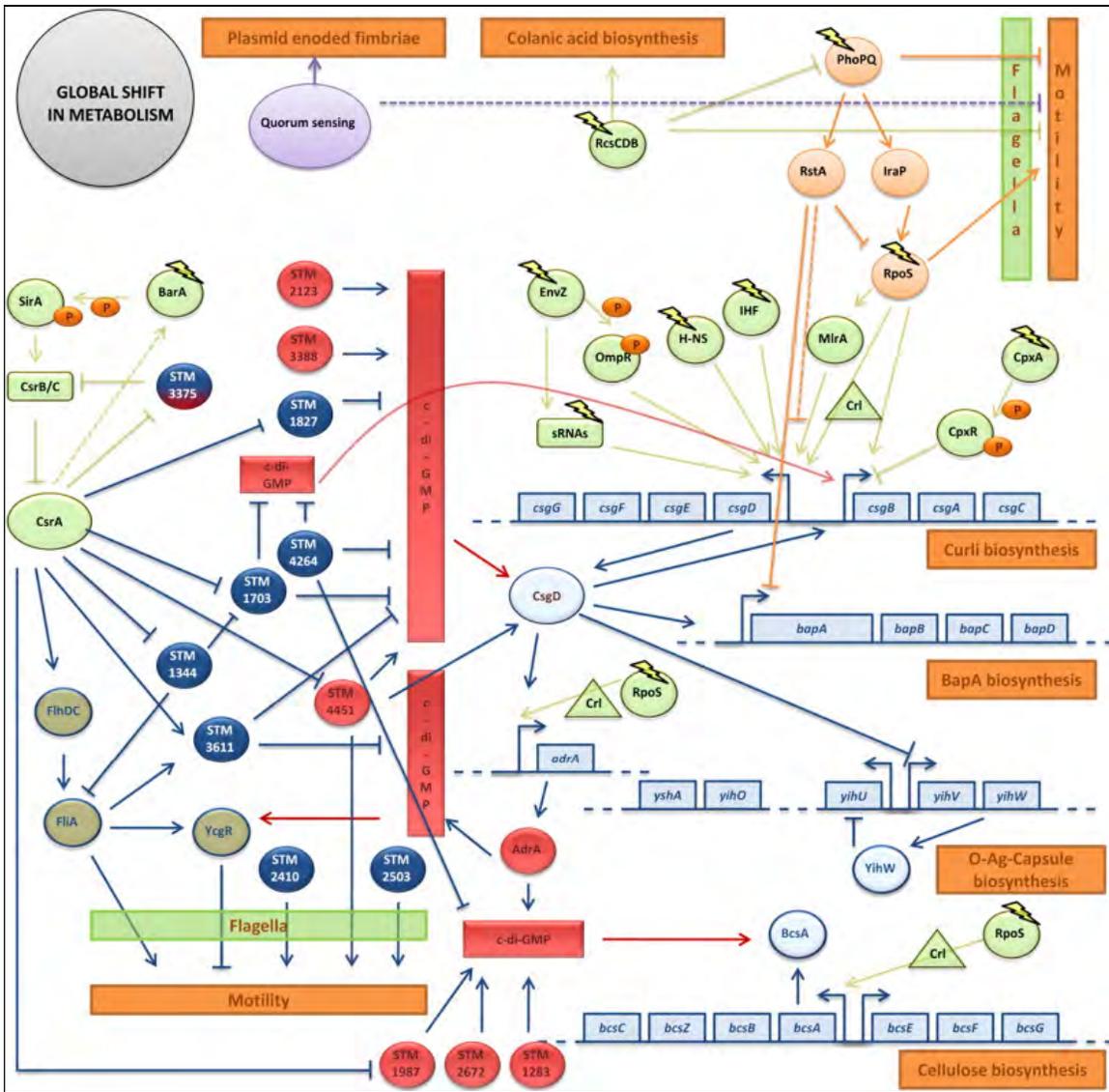


Figura 5. Red regulatoria de la formación de biofilm de *Salmonella* (Extraído de Steenackers *et al.*, 2012).

El principal regulador de este proceso es *csgD*, un regulador transcripcional de la superfamilia LuxR, que activa la producción de biofilm mediante la producción de celulosa y curli (Römling *et al.*, 2000). *CsgD* también promueve la síntesis de celulosa a través de la transcripción de *adrA*, un gen que codifica para una familia de proteínas GGDEF involucradas en la activación post-transcripcional de la síntesis de celulosa mediada por diguanosil monofosfato cíclico (c-di-GMP) (Römling *et al.*, 2000; Zogaj *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2004; Simm *et al.*, 2004). Se ha identificado que c-di-GMP regula la transición entre

el estado sésil y el móvil, una parte integral de la formación de biofilm y de otros comportamientos multicelulares.

Medidas de la expresión génica usando luciferasa como reportero han indicado que la producción de fimbrias agregativas (Tafi) pueden iniciar la formación de patrones superficiales en la colonia característicos del morfotipo RDAR (red, dry and rough) cuando se crece en medio conteniendo rojo Congo. Este morfotipo es un fenotipo multicelular caracterizado por la formación de un patrón de colonia mediado por fimbria y celulosa, el cual aumenta la resistencia de *Salmonella* a la desecación en ausencia de nutrientes (White *et al.*, 2006). Además, se controla principalmente mediante la expresión de los agonistas divergentes agfDEFG y agfBAC (csgDEFG / BAC) que codifican fimbrias agregadas finas (Tafi o curli) (Hammar *et al.*, 1995; White *et al.*, 2006). AgfD es un regulador positivo de la producción de Tafi mediante la activación de la transcripción de agfB, y estimula la producción de celulosa mediante la activación transcripcional de *adrA* (Hammar *et al.*, 1995). La expresión de BapA, una proteína de superficie de gran tamaño implicada en la formación del biofilm, está coordinada con los genes que codifican para curli, fimbria y celulosa, a través de la acción de *csgD* (Latasa *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2016).

La expresión de genes puede ser heterogénea y tener lugar en microcompartimentos formados dentro de la compleja estructura del biofilm. El análisis de expresión cuantitativa de *S. Typhimurium* demostró que CsgD se expresa de manera biestable durante el desarrollo de la biopelícula, donde una subpoblación de células expresa grandes cantidades de CsgD y se dedica a la producción de celulosa mientras que otra subpoblación que expresa pocas cantidades de CsgD y tiene un fenotipo móvil. La heterogeneidad fenotípica puede servir para mantener el potencial de desarrollo de la población (Grantcharova *et al.*, 2010). En *Pseudomonas aeruginosa*, se ha demostrado que la motilidad puede contribuir al establecimiento de una arquitectura madura de las biopelículas (Klausen *et al.*, 2003). Además, la generación de heterogeneidad en una población clonal es una estrategia para maximizar las posibilidades de supervivencia en un entorno en constante cambio. Consistente con esta hipótesis, las células que expresan

CsgD se han demostrado ser más resistentes a los desinfectantes y a la desecación a largo plazo.

La formación de biofilm le da a *Salmonella* una mayor resistencia a diferentes tipos de estrés ambiental respecto de su contraparte planctónica y como muestra ser el modo predominante de vida en el crecimiento bacteriano *in situ*, existe un vínculo directo entre la contaminación en ambientes de procesamiento de alimentos y la contaminación del producto final alimenticio (Olsen *et al.*, 2003; Rasschaert *et al.*, 2007). Por lo tanto, la persistencia de esta bacteria en biofilm es una fuente de contaminación de *Salmonella* y puede significar un importante riesgo para la salud.

#### **10. Impacto de los biofilms de *Salmonella* en la industria avícola**

La *Salmonella* representa un importante problema de salud pública mundial y es una amenaza bacteriana zoonótica emergente en la industria avícola donde las aves y los huevos son portadores de varios serotipos de *Salmonella*, siendo un vehículo para numerosos casos de infecciones humanas (Davies y Wales, 2010; Patel y Sharma, 2010). Cuando el proceso de limpieza en la industria alimentaria es ineficaz, las bacterias pueden formar una biopelícula en varias superficies, lo que mejora la tolerancia bacteriana al estrés, incluida la reducción de la susceptibilidad a desinfectantes, y promover la biocorrosión de equipos, que promueve la contaminación cruzada. Además, se producen pérdidas económicas dada la pérdida de energía debido al aumento fricción, mayor resistencia a la transferencia de calor y pérdida de presión (Mulcahy *et al.*, 2008).

*Salmonella* Enteritidis y otras serovariedades han sido consideradas una de las causas más comunes de gastroenteritis por intoxicación de origen alimentario en humanos dada su distribución a nivel mundial y sus implicaciones en salud pública debido a su transmisión a través de diversos alimentos, principalmente de origen avícola ya sea por una inadecuada cocción del pollo y huevos o por contaminación cruzada con otros alimentos. Se ha reportado que los alimentos de origen animal contaminados, especialmente huevos y

productos derivados de los huevos, están asociados a brotes de salmonelosis humana (Chousalkar *et al.*, 2016). Mundialmente, *Salmonella entérica* subsp. *entérica* se ha registrado como una de las causas más comunes de gastroenteritis humana, una enfermedad que causa inflamación del intestino y diarrea auto-limitante, produciendo unos 94 millones de casos y 150000 muertes por año (Majowicz *et al.*, 2010).

El contenido interno de los huevos recién puestos es un ambiente generalmente estéril. Pero al momento de la oviposición, los huevos tienen cierto grado de contaminación en la superficie debido al paso a través de la cloaca de la gallina. En un período de tiempo relativamente corto después de la puesta, en su exterior se pueden encontrar gran cantidad de microorganismos que, bajo condiciones apropiadas pueden penetrar en el interior de los huevos, crecer allí y alterarlos. Smith y Musgrove (2008) describieron que entre las bacterias encontradas en los huevos existen representantes de géneros tales como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* y *Staphylococcus*.

El riesgo de que un huevo se contamine por bacterias es bastante común y existen tres posibles vías por las cuales los microorganismos pueden contaminar los huevos: transmisión vertical, horizontal y lateral. Durante la transmisión vertical de *Salmonella* (desde los ovarios y oviductos infectados durante la formación del huevo), pueden darse tres fenómenos: la contaminación de la superficie del cascará al pasar el huevo por la vagina, contaminación de la yema en el ovario o contaminación durante el pasaje por el oviducto contaminado. Se ha encontrado que *Salmonella* Enteritidis se aloja en forma permanente en los tejidos reproductivos de las gallinas, donde el contenido del huevo puede ser infectado previo a la formación del cascarón (Okamura *et al.*, 2001). Las gallinas ponedoras no suelen presentar síntomas de la enfermedad cuando se infectan y continúan su postura y alimentación normalmente, así las infecciones en el ovario con *Salmonella* Enteritidis resultan en la eclosión de huevos infectados (Cox *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 1997).

La transmisión horizontal ocurre cuando *Salmonella* Enteritidis penetra el cascarón que ha sido contaminado con las heces de la gallina depositadas en el exterior del huevo al pasar

a través de la cloaca (Gast *et al.*, 1990). Además, *Salmonella* puede penetrar a través de los poros del cascarón (si está presente en la superficie del huevo) a medida que este se va enfriando, antes de que se seque la cutícula.

Una vez que el cascarón se ha formado, *Salmonella* puede establecerse en el interior del huevo antes de que se desarrolle en la superficie la barrera proteica que previene la invasión de bacterias, lo cual permite que este microorganismo colonice y sobreviva en el contenido interno del huevo (De Reu *et al.*, 2006). Una vez dentro, *Salmonella* se localiza en la albúmina, migra a través de ella y penetra la membrana vitelina hasta alcanzar la yema, un ambiente rico en nutrientes y libre de antimicrobianos. Para ello necesita poder enfrentar el contenido de péptidos antimicrobianos como la lisozima, la ovotransferrina y el alto pH, presentes en la albúmina (Guan *et al.*, 2006). En este sentido, Edwards y colaboradores (2002) propusieron que *Salmonella* Enteritidis posee un único set de genes de resistencia que están ausentes en otras serovariedades y por otra parte que los mecanismos de regulación de genes compartidos entre las distintas serovariedades le permitirían a *Salmonella* Enteritidis sobrevivir a las condiciones ambientales internas del huevo.

En la transmisión lateral la infección ocurre por contaminación a través del alimento, agua, e instalaciones o vectores, tales como aves silvestres, roedores, animales domésticos y humanos. La capacidad de penetración al interior del huevo por *Salmonella* aumenta con la duración del contacto con material contaminado, especialmente en condiciones de almacenamiento a altas temperaturas y alta humedad relativa (Kaiser y Lamont, 2001), pudiendo esta bacteria persistir por largos períodos de tiempo.

## **11. Control de los biofilms en la industria alimentaria**

La formación de biofilms en la industria representa una problemática dado que los microorganismos presentan mayor tolerancia a los desinfectantes de uso habitual, además de desarrollarse en superficies y lugares de difícil acceso y la alta capacidad de propagación o re-colonización. A esto se suma la incapacidad para poder visibilizarlos y

que aún no se han desarrollado métodos de control efectivos y económicos que se puedan implementar en granjas de producción intensiva. Los microorganismos pueden catalizar reacciones químicas y biológicas causando la corrosión de metales en tuberías y tanques, y pueden reducir la eficiencia de la transferencia de calor si los biofilms son lo suficientemente gruesos en intercambiadores de calor de placas y tuberías (Mittelman, 1998; Vieira *et al.*, 1993).

Muchos microorganismos patógenos forman biofilms en contacto con las superficies presentes en los establecimientos de producción, elaboración, envasado y conservación de alimentos. La adhesión de *Salmonella* en superficies alimentarias fue el primer reporte publicado (Duguid *et al.*, 1966). Luego se han reportado en varias publicaciones la capacidad de numerosos patógenos adheridos a alimentos o a superficies de la industria alimentaria tales como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7. Esto puede convertirse potencialmente en un reservorio de contaminación alimentaria o de transmisión de enfermedades.

### **11.1 Estrategias de prevención**

Dado que la producción de biofilm les confiere a las bacterias resistencia frente a los agentes desinfectantes, desarrollar estrategias para prevenir su formación en ambientes de industrias alimentarias es la mejor manera de erradicarlos (Coughlan *et al.*, 2016). Además de adoptar medidas de limpieza y desinfección más efectivas, debe tenerse en cuenta el diseño de instalaciones y equipos ya que tienen esquinas, grietas, válvulas y juntas inaccesibles, que son puntos vulnerables para la acumulación de biopelículas (Chmielewski y Frank, 2003). El uso de equipamiento adecuado junto con programas de higiene efectivos permite la eliminación de materiales no deseados, como microorganismos, residuos de desinfectantes y otros materiales (Dosti *et al.*, 2005; Simões *et al.*, 2006).

### **11.2 Estrategias de erradicación**

Una vez que el biofilm ya está establecido, la acción mecánica es una de las principales medidas para su eliminación o control (Maukonen *et al.*, 2003), porque la fricción actúa sobre la ruptura de la matriz, exponiendo capas más profundas y haciendo más accesibles los microorganismos. En general, los desinfectantes no penetran en la matriz de biopelículas después de un procedimiento de limpieza ineficiente y, por lo tanto, no destruyen toda la biopelícula (Simões *et al.*, 2006), alcanzando solo las capas externas. Por lo tanto, la limpieza es el primer paso para mejorar el saneamiento de los equipos e instalaciones (Hayes y Forsythe, 1998).

Aunque la utilización de altas temperaturas puede reducir la necesidad de fuerzas mecánicas, se ha reportado que tratamientos a altas temperaturas no aumentan la eficiencia de eliminación de biopelículas (Marion-Ferey *et al.*, 2003). La erradicación de las biopelículas podría lograrse mediante la combinación de tratamientos con diferentes espectros y modos de acción (Bridier *et al.*, 2011). Con este objetivo, se han evaluado numerosos procesos, asociando químicos, tratamientos naturales o físicos. Por ejemplo, una combinación de triclosan y sales de amonio cuaternario o furanonas halogenadas, antibióticos/desinfectantes, y nano y microemulsiones han sido capaces de inhibir la formación de biopelículas de *Salmonella* (Steenackers *et al.*, 2012).

En cuanto a los desinfectantes, estos deben ser efectivos, seguros y fáciles de manejar. Deben eliminarse fácilmente de las superficies, usando agua, sin dejar residuos en el producto final que puede afectar al consumidor (Simões *et al.*, 2010a). Los productos químicos utilizados actualmente en los procesos de desinfección pertenecen a los siguientes tipos: compuestos ácidos, biocidas, desinfectantes a base de aldehídos, cáusticos, cloro, peróxido de hidrógeno, yodo, isotiazolinonas, ozono, ácido peracético, fenoles, biguanidas y tensioactivos (Bremer *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2006). Sin embargo, en algunos casos usando la concentración recomendado de desinfectante, todavía existe resistencia de bacterias en biofilm. Estudios recientes muestran que el uso de ácido peracético no fue eficiente para eliminar biofilms formados en polipropileno y poliuretano (Ziech *et al.*, 2016). Una estrategia para prevenir la inducción de la adaptación bacteriana a desinfectantes podría ser aumentar sustancialmente la concentración del agente

antimicrobiano. Sin embargo, esta estrategia podría no ser totalmente efectiva, costosa y perjudicial para el ambiente.

### **11.3 Estrategias alternativas**

#### **11.3.1 Enzimas**

El uso de enzimas puede ser útil para mejorar el proceso de limpieza y son una opción viable para superar el problema de la formación de biofilms en la industria de alimentos (Meireles *et al.*, 2016). Las enzimas pueden degradar componentes de la matriz del biofilm logrando así su disrupción. También pueden desencadenar la liberación de células en biofilm, lo que hace que una cantidad de células se desprendan de la biopelícula. Las enzimas pueden atacar las células bacterianas, sin embargo, la función principal de las enzimas es degradar los componentes de lípidos, carbohidratos y ADN de la matriz extracelular, cortar los enlaces entre las celdas y luego separarlas, permitiendo un rápido deterioro de la integridad de la biopelícula (Coughlan *et al.*, 2016).

#### **11.3.2 Bacteriófagos**

Los fagos son virus que infectan y lisan las bacterias. Como tales, no se ven afectados por la resistencia a los antibióticos y, a diferencia de muchos antibióticos, pueden atacar a las bacterias dentro de los biofilms. Debido a la emergencia de resistencia a los antibióticos, el uso de bacteriófagos como herramientas para su control puede ser efectivo (Gutiérrez *et al.*, 2016). Pueden coexistir con su huésped insertándose en el genoma bacteriano (bacteriófagos lisogénicos) o destruirlos (bacteriófagos líticos; el tipo más adecuado para uso terapéutico). Los bacteriófagos líticos se replican dentro de sus huéspedes y luego liberan muchos bacteriófagos nuevos capaces de infectar más bacterias (Harper *et al.*, 2014). Los bacteriófagos se consideran actualmente un complemento alternativo a los antibióticos para infecciones bacterianas, especialmente para la inhibición o ruptura de biofilms. Estos se difunden fácilmente a través del EPS (Briandet *et al.*, 2008) y son activos contra biofilms pre-establecidos (Donlan, 2009). Por ejemplo, el fago T4 resultó efectivo contra el biofilm de *E. coli* en un cultivo limitado en glucosa, aunque la tasa de síntesis y

ensamblaje de fagos fue directamente proporcional a la cantidad de síntesis de proteínas en la célula huésped (Corbin *et al.*, 2001).

Por otra parte, muchos fagos producen despolimerasas que hidrolizan los polímeros extracelulares en el biofilm y desencadenan su interrupción. Por ejemplo, los fagos pueden difundir a través del alginato y el EPS de los biofilms de *Pseudomonas* (Hanlon *et al.*, 2001). También pueden infectar células persistentes, permanecer latentes dentro de ellas, y reactivarse cuando se vuelven metabólicamente activas. Los inconvenientes de los fagos son sus estrechos rangos de huéspedes, aunque las mezclas de fagos o fagos modificados podría proporcionar soluciones interesantes aplicables en granjas de producción.

### **11.3.3 Inhibidores de los sistemas de comunicación *quorum sensing* (QS)**

EL QS implica reconocimiento de moléculas de señalización dependiente de la densidad de bacterias, que resultan en la modulación de expresión génica (Skandamis y Nychas, 2012). La regulación de la expresión génica se ha propuesto como componente esencial de la fisiología de los biofilms (Parsek y Greenberg, 2005). Ramos *et al.* (2010) han demostrado que sobrenadantes libres de células de lactobacilos disminuyen las señales de *quorum sensing* (acyl homoserin lactonas) producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, un mecanismo utilizado por las bacterias para coordinar la formación de biofilms.

Algunos investigadores han propuesto que la inhibición de la detección del quórum puede representar un antibiótico natural (Simões *et al.*, 2010b). Varios inhibidores del QS, como las furanonas bromadas, han tenido éxito interfiriendo con la formación de biopelículas (Ni *et al.*, 2009; Sintim *et al.*, 2010).

### **11.3.4 Probióticos, bacterias ácido lácticas y bacteriocinas**

El término probiótico es una palabra que significa "a favor de la vida" y se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. En la actualidad, se define como "microorganismos vivos que, cuando se

consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables” (Hill *et al.*, 2014).

Las investigaciones sobre probióticos se han incrementado significativamente en los últimos años, principalmente aquellas orientadas a la aplicación en seres humanos y a la producción animal. En este sentido, el mayor consumo de probióticos por el hombre es en la forma de productos lácteos que contienen lactobacilos y/o bifidobacterias. Además de estas bacterias, algunas levaduras poseen también propiedades benéficas, siendo el género *Saccharomyces* el más documentado (Bourlioux *et al.*, 2002). En el caso de la producción animal, los probióticos pueden aportar beneficios en la mucosa y microbiota intestinal, disminuir el riesgo de infecciones y el desarrollo de enfermedades en el tracto digestivo y tener efectos beneficiosos sobre el sistema inmune. Se ha demostrado la eficacia del tratamiento de infecciones urogenitales con lactobacilos (Barrons y Tassone, 2008). Los mecanismos que explicarían tal utilidad están basados en la capacidad de los lactobacilos de adherirse y colonizar el tracto urogenital, previniendo e impidiendo el crecimiento de patógenos, y en el establecimiento de un ambiente ácido. Los efectos anti-adhesivos, anti-invasivos, anti-tóxicos e inmunomodulatorios están relacionados con interacciones bacteria-bacteria, bacteria-molécula y bacteria-célula eucariótica y por tanto están involucradas las superficies bacterianas. En todos los casos mencionados, la acción probiótica estaría mediada por un primer paso de adhesión de la bacteria potencialmente probiótica a otras bacterias, células o moléculas.

Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos producidos por bacterias que tienen propiedades bactericidas contra cepas de la misma especie y otras especies relacionadas. Actúan generalmente destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática mediante la formación de poros, lo que resulta en un desbalance de metabolitos o la disipación de la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Montville y Chen, 1998). El peróxido de hidrógeno es producido por lactobacilos constituyendo un mecanismo de defensa antimicrobiano no específico. Se ha comprobado que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus gasseri* productores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que adhirieron a células epiteliales

desplazan patógenos vaginales y co-agregan e inhibien el crecimiento de *Gardnerella vaginalis* (Mastromarino *et al.*, 2002)

Los ácidos orgánicos tales como el láctico y el acético producidos durante el metabolismo de las bacterias lácticas han sido ampliamente considerados como factores antimicrobianos. Se ha demostrado que el sobrenadante de *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* inhibió el crecimiento de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y enteropatogénica (EPEC), *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium difficile* (Forestier *et al.*, 2001).

Los lactobacilos formadores de biofilms se han utilizado como estrategia para la competencia y exclusión de patógenos transmitidos por alimentos en entornos de procesamiento de alimentos. Ouali *et al.* (2014) mostraron que las biopelículas que forman bacterias lácticas funcionan como una barrera natural o un microorganismo de exclusión competitiva frente a microorganismos presentes en el ambiente de procesamiento de alimentos, incluyendo *Salmonella*. Varias investigaciones han mostrado que las LAB son capaces de formar biofilms de especies múltiples en varios nichos y pueden evitar la radicación de microorganismos patógenos de manera eficiente mediante mecanismos de competencia, antagonismo e inhibición. Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos que pueden ser producidos por LAB y están implicados en la dinámica de los biofilms, permitiendo la absorción y desorción bacteriana, crear canales para el flujo de agua y nutrientes hacia zonas más profundas del biofilm y en el desprendimiento de las bacterias para formar biofilm en otros ambientes (Boles *et al.*, 2005). Se ha demostrado que estos biosurfactantes pueden tener actividad anti-adhesivas e inhibitorias de patógenos tales como *Escherichia coli*, *S. epidermis*, *S. aureus* y levaduras tales como *Candida sp.* (Rodrigues *et al.*, 2004, 2006a, b; Gudina *et al.*, 2010).

Por otro lado, se han utilizado biofilms de BAL, productores y no productores de bacteriocinas, como biofilms protectores para el control de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* O157:H7 formadores de biofilms, encontrándose una reducción de hasta seis unidades logarítmicas en los recuentos de bacterias patógenas con respecto a los controles. Estos resultados sugieren

que los lactobacilos podrían ser utilizados como una alternativa para el control de la formación de biofilms de bacterias patógenas en la industria alimentaria, sin que esto implique un riesgo para los consumidores (Gómez *et al.*, 2016).

### **11.3.5 Proteínas de superficie y metabolitos**

Las proteínas de la superficie bacteriana son estructuras que permiten la interacción entre ellas o con otras estructuras del medio. Están especialmente asociadas a fenómenos tales como autoagregación, floculación, colonización y formación de biofilms ya que están involucradas en la adhesión a superficies bióticas como otras bacterias o células eucariotas y/o superficies abióticas.

En general las moléculas superficiales que están involucradas en la adhesión se denominan adhesinas. Estas adhesinas pueden encontrarse localizadas sobre la superficie de la pared celular, formando apéndices celulares proteicos como las fimbrias o formando la capa S. La capa S es una estructura regular ubicada sobre la superficie externa de la célula, formada por subunidades de proteína o glicoproteína que se autoensamblan formando una red cristalina bidimensional de 5 a 25 nm de espesor que cubre por completo al microorganismo durante todas las etapas del crecimiento (Sleytr *et al.*, 2001). Se distribuyen ampliamente entre los procariotas, en todos los grupos taxonómicos de los dominios *Archaea* y *Bacteria*, tanto gram positivos como gram negativos. La mayor parte de las capas S aisladas de diferentes microorganismos están compuestas por un único tipo de proteína o glicoproteína con masa molecular de 40 a 200 kDa (Sleytr *et al.*, 2007). En la mayoría de los casos poseen una señal de secreción en el extremo N-terminal, el péptido señal, que dirige su pasaje al exterior celular a través de la vía secretoria general conocida como sistema de secreción tipo II (Boot y Pouwels, 1996). La secuencia señal consiste en 20 a 30 aminoácidos que son escindidos luego de la traslocación a través de la membrana citoplasmática dando como resultado la proteína de capa S madura (Sára & Sleytr, 2000). En nuestro laboratorio se ha demostrado la presencia de proteínas de capa S en distintos *Lactobacillus kefir* aislados de kefir (Garrote *et al.* 2004). Mientras que algunos

lactobacilos como *Lb. kefiri* presentan capa S cuyo tamaño puede variar, en otras especies como *Lb. plantarum* estas estructuras están ausentes.

La capacidad de los lactobacilos de adherirse a las superficies e incluso formar biofilm sumado con las proteínas superficiales con capacidad de autoensamblarse sobre diferentes superficies podrían ser utilizados como una estrategia alternativa de biocontrol de patógenos presentes en la industria alimentaria, especialmente aquellos capaces de formar biofilms, como *Salmonella*.

Singh *et al.* (2018) estudiaron la propiedad antimicrobiana y la formación de biofilm de bacterias lácticas y los sobrenadantes libres de células sobre dos cepas patogénicas *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Encontraron que los sobrenadantes de diferentes lactobacilos presentaron inhibición en el crecimiento de los patógenos e inhibieron la formación de biofilm entre un 72-86% y que los lactobacilos disminuyen la actividad metabólica de los patógenos estudiados. Dado que los sobrenadantes neutralizados también inhiben la formación de biofilm, aunque en menor grado, se cree que esta capacidad puede ser por efecto conjunto de los ácidos y compuestos proteicos (Singh *et al.*, 2018). Incluso se observa actividad anti-biofilm de lactobacilos tratados con calor y de sus sobrenadantes, sin encontrar diferencias significativas entre las células vivas y las muertas (Ciandrini *et al.*, 2017).

## **12. Antecedentes del grupo**

En nuestro laboratorio, se han estudiado las propiedades probióticas y tecnológicas de lactobacilos aislados de diversas fuentes alimentarias como el kefir, así como de sus productos metabólicos. Dentro de estos productos se pueden mencionar: ácidos orgánicos, vitaminas (fundamentalmente del grupo B), etanol, dióxido de carbono, acetaldehído, diacetilo, proteínas de superficie de algunos microorganismos que se liberan al medio (capa S) y exopolisacáridos (Golowcycz *et al.*, 2007; Medrano *et al.*, 2008; Garrote *et al.*, 2010). Garrote *et al.* (2000) estudiaron la actividad antibacteriana del kefir, demostrando la capacidad inhibitoria de sobrenadantes de leche fermentada contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Kakisu *et al.* (2007) probaron que el kefir

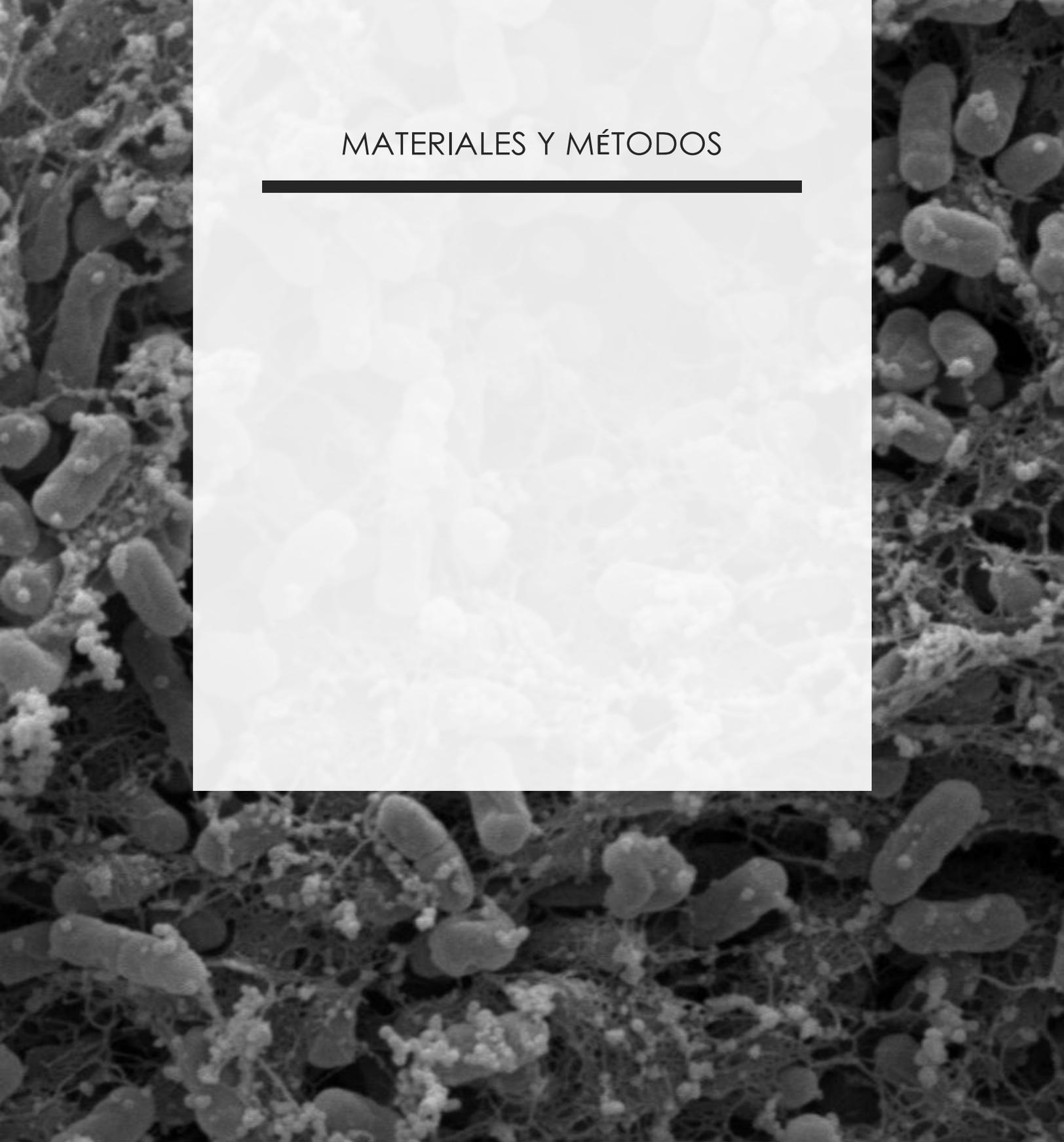
disminuye la viabilidad y la germinación de esporas de *Bacillus cereus*. También se demostró su actividad antifúngica (Gamba *et al.*, 2015). Estudios *in vitro* sobre células epiteliales intestinales han demostrado que microorganismos aislados de kefir poseen capacidad de antagonizar el efecto de patógenos intestinales, tales como *Escherichia coli*, *Shigella spp.* y *Salmonella spp.* Se ha probado que cuando *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, aislado de kefir, es incubado sobre cultivos de la línea celular HEP-2 previene la unión de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y minimiza las alteraciones causadas por el patógeno sobre los enterocitos. Este efecto no es dependiente de la viabilidad del probiótico y no puede ser explicado por exclusión competitiva (Hugo *et al.*, 2008). Estudios posteriores demostraron que el antagonismo de esta cepa sobre la virulencia de *E. coli* se relaciona con su capacidad de inhibir los efectos citotóxicos de la toxina Shiga 2 producida por EHEC (Kakisu, 2010). También se ha demostrado la capacidad cultivos mixtos de bacterias (*Lb plantarum* 83114 y *L lactis* 8221, *Lb kefir* 8348) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* 8112 y *Kluyveromyces marxianus* 8154) aislados de kefir de prevenir la invasión de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* a células en cultivo HEP-2 y de reducir los daños celulares causados por el patógeno (Bolla *et al.*, 2016). Cepas de *Lactobacillus kefir* son capaces de inhibir la adhesión e invasión de *Salmonella* Typhimurium a células Caco-2/TC-7, a través de la liberación al medio de cultivo de proteínas de capa S. Este efecto es dependiente de la cepa en estudio y de las características de la capa S producida (Golowcycz *et al.*, 2007; Mobili *et al.*, 2010). Londero *et al.* (2015) demostraron que las propiedades antagónicas contra *Salmonella* de un cultivo mixto de cepas aisladas de gránulos de kefir (*Lb plantarum* 83114, *Lb kefir* 8348 y *K marxianus* 8154) se mantienen después de su desarrollo en suero de leche. Se ha demostrado también la modulación de la respuesta inmune con microorganismos de kefir. Muchos microorganismos aislados de kefir han demostrado tener actividad inmunomoduladora. Romanin *et al.* (2010) demostraron la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial *in vitro* de la cepa *K marxianus* 8154 y resaltaron la necesidad de que la levadura se encuentre viable para ejercer el efecto. Por otro lado, Carasi *et al.* (2015) demostraron que la administración a ratones de la cepa *Lb kefir* 8348

modula la expresión de mediadores proinflamatorios y aumenta las moléculas anti-inflamatorias tanto en sitios inductivos como efectores del sistema inmune. Del mismo modo, informaron un incremento en la producción de IgA y mucina por lo que este probiótico puede resultar importante en regulación de la homeostasis. Además, Medrano *et al.* (2011) demostraron que el polisacárido de los gránulos de kefir (kefiran) administrado a ratones en el agua de bebida produce una modificación del balance de células del sistema inmune asociado a mucosas, aumentando el número de células productoras IgA y macrófagos.

Todos estos resultados indican una gran potencialidad de estos microorganismos para ser utilizados en la industria alimentaria, donde se necesita asegurar la inocuidad, la calidad y la seguridad de los alimentos. Controlar la adhesión de microorganismos a las superficies en contacto con alimentos es un paso esencial para cumplir los objetivos del procesamiento de alimentos. La mayoría de los patógenos involucrados en las enfermedades transmitidas por los alimentos, entre ellos *Salmonella*, pueden adherirse y formar biopelículas en la mayoría de los materiales utilizados y en casi todas las condiciones ambientales encontradas en plantas de producción de alimentos. Las bacterias lácticas pueden ser buenas candidatas para evitar la formación de biofilms de patógenos mediante la modificación de la superficie de adhesión, por competencia por los nutrientes disponibles o por la producción de compuestos antimicrobianos o anti-biofilm.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---



# MATERIALES Y MÉTODOS

## Capítulo 1 – Caracterización de la formación de biofilm por *Salmonella*

### 1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Se seleccionaron dieciséis cepas de *Salmonella* entérica serovariedades Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum, que son las especies a controlar indicadas por el Plan Nacional de Sanidad Avícola de Argentina, aisladas de pollos, aves de corral y huevos (Tabla 1) y fueron recibidas de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Instituto de Genética Veterinaria) y Estación Agrícola Experimental (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). La información detallada sobre el método de recuperación de *Salmonella* fue descrito por otros autores (Rodríguez *et al.*, 2018) y la identificación se realizó por prueba bioquímica convencional y serotipado empleando anticuerpos somáticos y flagelares.

Serotipo <i>Salmonella</i>	Código	Origen
Enteritidis <sup>a</sup>	SE 101	Humano
Thyphimurium <sup>b</sup>	ST 102	Pollo
Thyphimurium <sup>b</sup>	ST 103	Pollo
Gallinarum <sup>b</sup>	SG 104	Pollo
Enteritidis <sup>b</sup>	SE 105	Pollo
Enteritidis <sup>b</sup>	SE 106	Pollo
Enteritidis <sup>b</sup>	SE 107	Pollo
Thyphimurium <sup>c</sup>	ST 108	Huevo
Gallinarum <sup>c</sup>	SG 109	Pollo
Gallinarum <sup>c</sup>	SG 110	Pollo
Gallinarum <sup>c</sup>	SG 111	Pollo
Enteritidis <sup>c</sup>	SE 112	Pollo
Enteritidis <sup>c</sup>	SE 113	Pollo
Enteritidis <sup>c</sup>	SE 114	Guano
Enteritidis <sup>c</sup>	SE 115	Guano
Enteritidis <sup>c</sup>	SE 116	Guano

**Tabla 1. Cepas de *Salmonella*** <sup>a</sup> corresponde a cepas recibidas del Dr. Horacio Lopardo (HATL), <sup>b</sup> cepas recibidas de Dr. Gerardo Leotta, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP

CONICET y <sup>C</sup> cepas recibidas de la Estación Experimental Agrícola INTA Concepción del Uruguay.

Excepto la cepa SE 101 que fue estudiada en nuestro grupo de investigación (Golowczyc, 2008), el resto de las cepas no han sido estudiadas previamente.

Los stocks bacterianos se prepararon a partir de cultivos crecidos durante 18 horas a 37°C en medio Luria Bertani (LB) a los cuales se adicionó glicerol al 15% v/v y se conservaron a -80°C en criotubos. A partir de los stocks, se realizó un repique de cada cepa en medio de cultivo LB y se incubó a 37°C durante 18 horas. El mismo se conservó en la heladera como cepario de trabajo. Para los ensayos, se realizaron repiques en medio LB fresco a partir de estos cultivos.

## **2. Estudios de propiedades superficiales de *Salmonella***

### **2.1 Ensayos de autoagregación de *Salmonella***

La autoagregación es la capacidad que presenta una célula bacteriana de interactuar con otras bacterias de la misma población formando grumos visibles macroscópicamente que sedimentan clarificando el medio. Para determinar la capacidad autoagregante de las cepas estudiadas, se siguió la metodología empleada por Golowczyc (2008), con algunas modificaciones. A partir de cultivos obtenidos como se indica en el primer punto se centrifugaron a 7000 xg en centrífuga Eppendorf durante 10 minutos para obtener el pellet de bacterias. Cada pellet se lavó con 5 ml de buffer fosfato dos veces para eliminar restos de medio de cultivo centrifugando en las mismas condiciones antes mencionadas y luego se resuspendieron las bacterias en buffer fosfato hasta lograr una  $DO_{600}=1$ , mediante espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Spectronic Instruments, U.S.)

Se adicionaron 2 ml de estas suspensiones en cubetas de vidrio cilíndricas de 10 mm de diámetro las cuales se mantuvieron a 37°C en forma estática durante 20 horas. Se determinó la caída de DO a 600 nm registrando el valor inicial ( $DO_i = 1$ ) y a las 20 horas ( $DO_t$ ). Se expresó el resultado como:

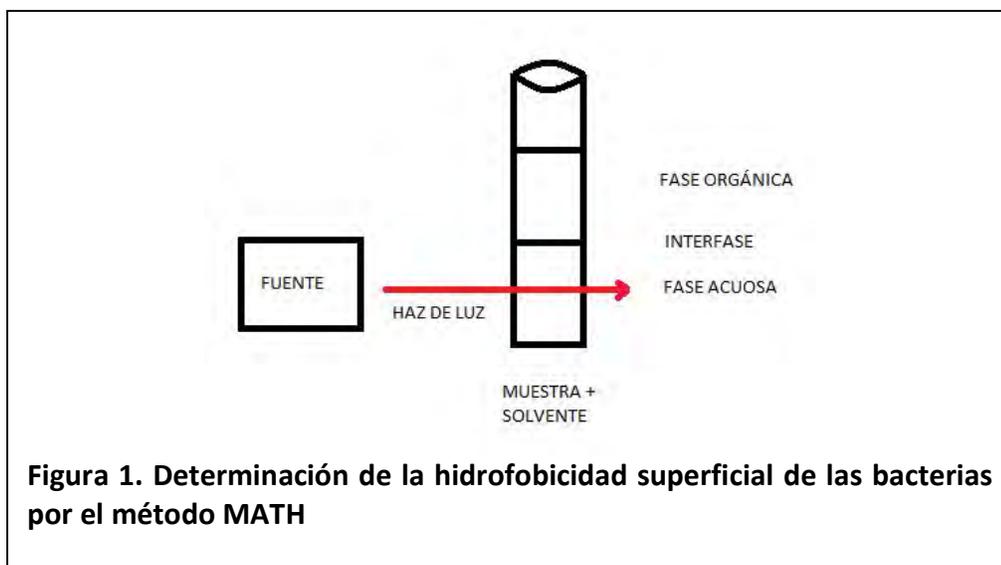
$$\% \text{ Auto-agregación} = 100 * (DO_i - DO_t) / DO_i$$

## 2.2 Hidrofobicidad de las cepas de *Salmonella*

La hidrofobicidad de las cepas de *Salmonella* fue evaluada por el método denominado MATH (Microbial Adhesion to Hexadecan) el cual se basa en la tendencia de los microorganismos a adherirse a la superficie de hidrocarburos líquidos, luego de un breve período de contacto (Ofek y Doyle, 1994). Se utilizó n-hexadecano o xileno (J. T. Baker, Mallinckrodt Inc.) como hidrocarburos.

Cultivos obtenidos según lo indicado en punto 1 se centrifugaron durante 10 minutos a 7000 xg. Cada pellet obtenido se resuspendió en PBS hasta  $DO_{600}=1$ . Dos mililitros de la suspensión se pasaron a una cubeta cilíndrica de 10 mm de diámetro y se le agregó un volumen de 0,4 ml de solvente orgánico hexadecano o xileno. El añadido de solvente se realizó evitando producir turbulencias y por lo tanto mezclado de las fases. Se midió la  $DO_{600}$  con espectrofotómetro ( $DO_i$ ). Luego de mezclar las fases con vortex durante 120 segundos se dejó reposar a temperatura ambiente hasta que las fases se vuelven a separar. En este paso, *Salmonella* se reparte entre ambas fases en función de su hidrofobicidad superficial, luego del tiempo indicado, se volvió a medir la  $DO_{600}$  ( $DO_f$ ), donde el haz de luz pasa por la fase acuosa, como se observa en el esquema de la Figura 1. El porcentaje de hidrofobicidad se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = (DO_i - DO_f) * 100 / DO_i$$



**Figura 1. Determinación de la hidrofobicidad superficial de las bacterias por el método MATH**

### **3. Capacidad de formación de biofilm en distintas condiciones de crecimiento**

#### **3.1 En placa de 24 pocillos**

Se colocó 1 ml de medio de cultivo por fosa en placa de 24 pocillos (JET- Biofil, China) y se inoculó con 10 µl de cultivos (1/100) de diferentes cepas de *Salmonella*, obtenidos según punto 1. La placa se incubó durante el tiempo a evaluar (24 o 48 horas) a distintas temperaturas (20°C, 28°C y 37°C) en estufa abierta a la atmósfera. Luego de la incubación, se descartó el medio y se lavó cada fosa dos veces con 1 ml de PBS para eliminar las bacterias no adheridas. El biofilm formado se cuantificó mediante las siguientes técnicas.

##### **3.1.1 Cuantificación por tinción con cristal violeta**

Este método es ampliamente utilizado para cuantificar rápidamente la capacidad de un microorganismo de formar biofilm. Fue descrito por primera vez por Christensen *et al.* (1985) para estudiar la adherencia de estafilococos coagulasa-negativos a superficies de plástico y luego fue modificado para mejorar la exactitud en el estudio de la formación de biofilm (Stepanovic *et al.*, 2000). Se utilizó esta técnica con algunas modificaciones. La misma consiste en permitir el crecimiento de las bacterias contenidas en los pocillos de una placa de polietileno con 24 pocillos. El biofilm formado se cuantifica mediante tinción con cristal violeta, un colorante básico que se une a moléculas negativamente cargadas, tiñendo tanto a las bacterias adheridas a la placa como a la matriz extracelular. Luego de la preparación de la placa como se mencionó en el punto anterior, la misma se dejó secar a temperatura ambiente durante una hora para permitir la fijación del biofilm. Transcurrido este tiempo, se tiñó con 500 µl de solución de cristal violeta al 0.2 % p/v durante 30 minutos. A continuación, se descartó el colorante y se realizaron 3 lavados sucesivos con 1 ml de PBS por fosa para eliminar el colorante adherido a la placa y no al biofilm. El colorante se extrajo con 300 µl de etanol 96° por fosa durante 30 minutos. Se transfirieron 150 µl del contenido de cada pocillo a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 595 nm en lector de placas Biotek® Synergy HT (Biotek® Instruments, Inc. Vermont, USA).

Se realizaron tres ensayos independientes con triplicados en cada uno para las condiciones evaluadas y luego se calcularon los promedios de cada tratamiento. Como

control negativo se utilizó medio de cultivo sin inocular con *Salmonella* en las mismas condiciones ensayadas.

Para clasificar las cepas de *Salmonella* según su capacidad de formar biofilm se utilizó el criterio descrito por Stepanovic *et al.* (2004) y Bhowmick *et al.* (2011). El valor de DO de corte (DO<sub>c</sub>) se definió como 3 desviaciones estándar por encima de promedio de DO del control negativo. Los criterios de clasificación fueron:

$DO \leq DO_c =$  NO FORMA

$DO_c < DO \leq 2 \times DO_c =$  DÉBIL

$2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c =$  MODERADA

$4 \times DO_c < DO =$  FUERTE

### 3.1.2 Cuantificación por recuento en placa

Se determinó el número de bacterias viables presentes en el biofilm de *Salmonella* desarrollado en placas de poliestireno. Para ello, una vez formado el biofilm según el punto 3.1, los mismos fueron lavados con PBS estéril para remover las células no adheridas y se resuspendieron las bacterias adheridas en 1 ml de PBS estéril con ayuda de scrapper. Posteriormente, se hace pasar a través de una aguja (25G, 0.5 x 16 mm) para separar los agregados celulares y se hicieron diluciones seriadas en solución salina. Los biofilms disgregados se sembraron en placa de ágar LB por triplicado, las cuales se dejaron incubar en estufa a 37°C para luego contar las unidades formadoras de colonia (UFC/ml).

### 3.2 Sobre diferentes superficies

Para determinar la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* sobre distintas superficies encontradas en la industria avícola, se utilizaron discos de **acero inoxidable** de tipo AISI 304 de 13 mm de diámetro, discos de **vidrio** de 13 mm de diámetro y **poliestireno**. Antes de cada ensayo, los discos de acero inoxidable y de vidrio se lavaron con dextran caliente durante 30 segundos, luego se enjuagaron con agua corriente y luego con agua destilada. Se realizaron 5 enjuagues con etanol 96 y por último con agua destilada exhaustivamente. Se esterilizaron en autoclave y se dejaron secar en estufa. Los discos se colocaron en pocillos de una placa de 24 pocillos e inoculados (1/100) en medio LB con cultivos frescos de *Salmonella* e incubados a 28°C durante 24 horas. La

cuantificación se realizó por la técnica de cristal violeta como se detalló anteriormente en el punto 3.1.1. Como control se utilizó medio LB sin inocular y los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **4. Formación de biofilm en la superficie aire-líquido en tubo**

Para determinar visualmente la capacidad de formación de biopelícula de las cepas de *Salmonella* estudiadas se utilizó el método descrito por Weiss-Muszkat *et al.* (2010) y Aya-Castañeda *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Las cepas de *Salmonella* se crecieron en medio LB tal como se indicó en el punto 1. Estos cultivos se utilizaron para inocular 5 ml de medio LB sin NaCl pH=7,0 al 1% v/v en tubos de vidrio de 15ml. Los mismos se mantuvieron en estufa a 28°C en agitación a 200 rpm durante 6 horas luego de lo cual se mantuvieron estáticos por 96 horas. La formación de biofilm se detectó por la capacidad de formar una película flotante en la interfaz aire-líquido (Latasa *et al.*, 2012). Se registró en forma fotográfica la formación de una película en la interfase aire-líquido cada 24 horas. Se utilizaron como tubos de control medio de cultivo sin inocular en todas las observaciones.

#### **5. Estudio de la producción de curli y celulosa por morfología de colonia en rojo congo**

El ensayo se basó en el método descrito por Römling (2003) y Bokranz (2005). Se crecieron las cepas de *Salmonella* tal como se indicó en el punto 1. Se tomaron 10 µl de cultivo y se sembraron en cajas de petri conteniendo ágar LB sin NaCl suplementado con 40 mg/L de Rojo Congo (Sigma, Saint Louis, MO) y 20 mg/L de Coomassie brilliant blue (Sigma, Saint Louis, MO). Posteriormente, las placas fueron incubadas durante 72 horas a 28°C. Se realizó un registro fotográfico de la morfología de las colonias de *Salmonella* en presencia del colorante y se clasificaron según Römling *et al.* (2000) para *Salmonella*:

RDAR fenotipo rojo, seco y rugoso. Expresa curli y celulosa.

PDAR fenotipo rosa y lisa. Expresa celulosa.

SAW fenotipo blanca y suave. No expresa curli ni celulosa.

## **6. Determinación de la producción de celulosa por morfotipo en calcoflúor**

Para determinar cualitativamente la producción de celulosa presente en la matriz del biofilm de *Salmonella*, se utilizó la técnica descrita por Zogaj *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Se prepararon placas de Petri de agar LB sin NaCl que contenían 200 µg/l de calcoflúor (fluorescent brightener 28, Sigma, Saint Louis, MO) el cual se agregó al agar a 40°C previamente esterilizado por filtración.

Un cultivo obtenido como se indicó en el punto 1 se centrifugó a 10000 xg durante 10 minutos, y se resuspendió en igual volumen de PBS. Se tomaron 10 µl de las suspensiones de bacterias y se inocularon las placas de Petri previamente preparadas. Se incubó a 28°C durante 48 horas. La producción de celulosa se evaluó mediante la comparación de la fluorescencia de las cepas de *Salmonella* en transiluminador bajo luz UV (366 nm) y se realizó un registro fotográfico.

## **7. Evaluación estructural del biofilm por microscopía láser confocal**

Los biofilm de *Salmonella* se crecieron en placa de 24 pocillos colocando en cada pocillo un vidrio Thermanox™ de 13 mm de diámetro y dejando incubar en medio LB durante 48 hs a 28°C. Luego de la incubación, se descartó el medio de cultivo y se lavó para eliminar las células no adheridas o planctónicas. Se tiñó con 1 ml de una solución de calcoflúor (Sigma, Saint Louis, MO) 1 mg/ml diluído diez veces en PBS durante 10 minutos en oscuridad. El calcoflúor es un fluorocromo no específico que se une a la celulosa presente en la matriz del biofilm de *Salmonella*. Luego de la incubación, se lavó el colorante y se agregaron 200 µl por fosa de solución conteniendo los fluoróforos SYTO 9 y Ioduro de Propidio diluídos 1/10000, que permite distinguir células vivas (verdes) y células muertas (rojas) respectivamente (LIVE/DEAD BacLight Bacterial viability kit, Thermofisher). Luego de 10 minutos de incubación en oscuridad, se lavó con PBS hasta sacar el resto de colorante. Se incubó durante 10 minutos con solución de formol 4% para permitir la fijación y luego se montaron los vidrios con 5 µl de medio de montaje en un portaobjetos. Las imágenes se tomaron con el microscopio óptico Olympus FV1000. La edición de las

microfotografías obtenidas se realizó mediante el software Fiji ImageJ 1.48v para Windows (National Institutes of Health, USA).

## Capítulo 2 – Caracterización superficial y formación de biofilm de lactobacilos

### 1. Cepas empleadas

Para este estudio se emplearon siete cepas de lactobacilos de la colección del CIDCA, que han sido caracterizadas previamente por el grupo de trabajo. Entre las principales características de estas cepas, destacan la capacidad o no de producir proteínas de capa S o exopolisacárido (EPS). Estas propiedades se resumen en la Tabla 2.

Cepa	Origen	Capa-S <sup>c</sup>	EPS (mg/L) <sup>d</sup>
<i>Lb. kefir</i> CIDCA 83113	<sup>a</sup> AGK1	66 kDa	NP
<i>Lb. kefir</i> CIDCA 8321	<sup>a</sup> AGK2	66kDa	NP
<i>Lb. kefir</i> CIDCA 8344	<sup>a</sup> AGK4	71 kDa	NP
<i>Lb. kefir</i> JCM 5818	<sup>b</sup> cepa de referencia	69 kDa	NP
<i>Lb. plantarum</i> CIDCA 83114	<sup>a</sup> AGK1	NP	100.3
<i>Lb. plantarum</i> CIDCA 8327	<sup>a</sup> AGK2	NP	160.4
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133	leche	NP	NP

**Tabla 2. Cepas de empleadas en este estudio.** <sup>a</sup>Cepas aisladas de gránulos de kefir pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. (Garrote, 2001). <sup>b</sup>JCM: Japan Collection of Microorganisms (Reiken, Japón). <sup>c</sup>Mobili (2008). <sup>d</sup>Hamet *et al.*, (2015). NP (no produce) EPS (exopolisacárido).

Los stocks de cultivos se almacenaron a -80°C en suspensión al 15% de leche como crioprotector. En todos los experimentos, se procedió a realizar un primer repique de cada microorganismo, a partir del cepario conservado a -80°C, en caldo Man,

Rogosa, Sharpe (MRS, Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Luego de incubar 48 horas a 30°C, el cultivo logrado se conservó en la heladera como cepario de trabajo. A partir de ese primer repique se realiza un segundo repique al 1 % en MRS para trabajar. En todos los ensayos los lactobacilos se incubaron en medio MRS durante 48 horas a 30°C.

## **2. Estudio de propiedades superficiales de lactobacilos**

### **2.1 Autoagregación de bacterias lácticas**

Para la determinación de la capacidad autoagregativa de los lactobacilos, se midió la disminución (caída) de la densidad óptica a 600 nm tal como se describió anteriormente para las cepas de *Salmonella* en el punto 2.1 del Capítulo 1.

### **2.2 Hidrofobicidad de bacterias lácticas**

Para estudiar la hidrofobicidad de las superficies de las bacterias se midió la capacidad de adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH) según se describió para las cepas de *Salmonella* en el punto 2.2 del Capítulo 1.

## **3. Formación de biofilm**

### **3.1 Cuantificación de la formación de biofilm de lactobacilos**

Para determinar la capacidad de formación de biofilm de las cepas de lactobacilos, se inocularon al 1% v/v en placa de 24 pocillos según se explicó para las cepas de *Salmonella* en el punto 3.1. del capítulo 1 La placa se incubó en estufa durante 48 horas a 28°C en medio MRS (Difco) o BHI.

#### **3.1.1 por cristal violeta (CV)**

Luego de la incubación a 28°C durante 48 horas, los pocillos se lavaron dos veces con PBS y la coloración con CV se realizó de la misma manera que para las cepas de *Salmonella*.

#### **3.1.2 por recuento de viables**

Luego de la incubación a 28°C durante 48 horas, los pocillos se lavaron dos veces con PBS y las bacterias en biofilm se resuspendieron mediante scrapper en triptona 0,1 % p/V. Se realizaron diluciones 1/10 en triptona 0,1% v/v y se sembraron en placas con MRS agar. Se dejaron incubar 48 horas en estufa a 30°C y se realizaron los recuentos de UFC.

Como controles negativos se utilizaron los medios de cultivos estériles empleados sin inocular.

### **3.2 Desarrollo en diferentes condiciones de cultivo**

#### **3.2.1 Sobre distintas superficies**

Se estudió la capacidad de los lactobacilos de formar biofilm en las superficies de discos de acero inoxidable, vidrio y poliestireno tal como se describió en el punto 3.3 del capítulo 1 utilizando MRS como medio de cultivo.

#### **3.2.2 En distintos medios de cultivo**

En cada pocillo de una placa de poliestireno de 24 pocillos, se añadió 1 ml de medio de cultivo MRS o BHI y se inoculó con las cepas al 1% v/v con cultivos de lactobacilos obtenidos como se indicó en el punto 1 de este capítulo. La placa se dejó incubar en estufa a 28°C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la placa con PBS y se determinó la formación de biofilm por la técnica de cristal violeta. Como controles negativos se utilizaron los medios de cultivo sin inocular. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado para cada muestra.

### **4. Co-agregación de lactobacilos con *Salmonella***

Las suspensiones de *Salmonella* se obtuvieron de igual forma que para los ensayos de auto-agregación. Tanto para *Salmonella* como para *Lactobacillus*, las bacterias se resuspendieron en PBS hasta lograr  $DO_{600}=0,6$ . Del mismo modo se obtuvieron las suspensiones de lactobacilos. En cubeta de vidrio, se mezcló 1 ml de la suspensión de lactobacilos con 1 ml de la suspensión de *Salmonella*. Se midió la  $DO_{600}$  inicial de la mezcla y luego de 20 horas manteniendo la cubeta inmóvil a 37°C.

## **Capítulo 3 - Bacterias lácticas y sus metabolitos sobre la capacidad formadora de biofilm de *Salmonella***

### **1. Cinética de formación de biofilm por microscopía de fluorescencia**

Se determinó la formación de biofilm de la cepa *S. Enteritidis* 115 (SE 115) a distintos tiempos mediante microscopía de fluorescencia. Para llevar a cabo este estudio las bacterias se incubaron a 28°C en 1 ml de medio BHI en placa de 24 pocillos a los cuales se les colocó discos thermanox®. Luego de lavar para remover las bacterias no adheridas, las bacterias fueron teñidas con el fluoróforo SYTO 9 (LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, Thermofisher) al 0,001% v/v y luego se fijaron con formaldehído al 4%. Se sacaron los discos de la placa con pinza, se colocaron sobre un portaobjetos y se taparon con un cubreobjetos para observarlos en microscopio de fluorescencia con filtro apropiado (Leica).

### **2. Efecto de los lactobacilos en la formación de biofilm de *Salmonella***

#### **2.1 Co-incubación**

En placa de cultivo de 24 pocillos con 1 ml de medio BHI al se inoculó al 1 % v/v con cultivo de la *Salmonella* SE 115 y se co-incubó inoculando al 1% con cultivos de lactobacilos. Se dejó incubar durante 48 horas en estufa a 28°C y posteriormente las fosas fueron lavadas dos veces con PBS y se procedió a la evaluación del biofilm formado.

##### **2.1.1 Por recuento**

Se determinó la cantidad de bacterias en biofilm por la técnica de recuento en placa en medios específicos, utilizando ágar MRS para el recuento de lactobacilos y ágar Hectoen para *Salmonella*.

##### **2.1.2 Por microscopía láser confocal**

Los biofilms fueron tratados con Syto 9 y yoduro de propidio para diferenciar bacterias vivas (teñidas de color verde) de bacterias muertas (teñidas de color rojo), como se explicó en el punto 7 del Capítulo 1.

#### **2.2 Pre-incubación**

En placa de 24 pocillos se inoculó con cultivo de lactobacilos al 1% v/v en 1 ml medio BHI y se incubó durante 24 horas a 28°C. Transcurrido este tiempo, se descartó en medio y se lavó con PBS para remover las bacterias no adheridas. Se colocó 1 ml de medio BHI fresco por pocillo y se inoculó con un cultivo de SE 115 al 1% v/v. Se incubó 48 horas a 28°C y se determinaron las bacterias en el biofilm mediante recuentos como se indica en el punto 2.1.1 de este capítulo.

### **3. Efecto del sobrenadante libre de células de lactobacilos sobre el biofilm de *Salmonella***

#### **3.1 Obtención de sobrenadantes**

Se utilizaron tres cepas de diferentes especies de lactobacilos *Lb plantarum* 83114, *Lb. kefirii* 8321 y *Lb. delbreukii subsp. lactis* 133. Se crecieron en medio BHI o MRS a 30°C durante 48 horas. Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 7000 x g durante 10 minutos y los sobrenadantes (SN) obtenidos se filtraron con filtro de 0,22 µm (Millipore) para sacar las bacterias que hayan quedado en suspensión, obteniéndose un sobrenadante libre de células a pH de cosecha (SNa). De cada uno de ellos se determinó el pH. Para el estudio del efecto de SN neutralizados (SNneu) se llevó el pH a 7,0 con solución de NaOH 5M.

#### **3.2 Estudios de biofilm**

##### **3.2.1 Por cristal violeta**

En placa de 24 pocillos se probaron las concentraciones 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70 y 90% de SNa o SNneu completando el volumen final de 1 ml con medio BHI. Se inocularon los pocillos con un cultivo de SE 115 al 1% v/v. Se dejó incubar a 28°C por 48 horas. Luego de la incubación las bacterias en biofilm se cuantificaron por tinción con CV. Como control se utilizó el medio de cultivo sin el tratamiento con los SN de lactobacilos. Este ensayo se realizó por duplicado en dos ensayos independientes.

##### **3.2.2 Por microscopía láser confocal**

Luego de la incubación de SE 115 en presencia de 50% v/v SNa y SNneu de la cepa *Lb kefirii* 8321 crecida en MRS, las bacterias en el biofilm se tiñeron con SYTO9 y se observaron en microscopio láser confocal como se indicó en el punto 7 del Capítulo 1.

#### **4. Efecto de las proteínas de superficie de lactobacilos**

##### **4.1 Extracción de proteínas de superficie de lactobacilos**

En nuestros estudios, se obtuvieron proteínas de superficie de lactobacilos sin capa S, *Lb plantarum* 83114, *Lb plantarum* 8327, y con capa S como *Lb kefir* 83113, *Lb kefir* 8321, *Lb kefir* 8344 todas de tamaño aproximado de 66 KDa y *Lb kefir* 5818 de 69 KDa (Mobili, 2008). Se empleó la técnica de extracción con LiCl 5M descrita por Mobili (2008). Los cultivos de lactobacilos se obtuvieron en 25 ml de medio MRS durante 48 horas a 30°C. Los mismos se centrifugaron durante 10 minutos a 11000 x g en centrífuga Sorvall, se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó dos veces con PBS y luego se resuspendió en 5 ml de LiCl 5M. Se pasó por el vortex durante 60 segundos a velocidad media y luego a velocidad máxima. Se centrifugó a 5000 xg durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se dializó con membrana de diálisis de celulosa de 14 KDa de tamaño de exclusión y 33mm de ancho (Sigma, Saint Louis, MO) durante 48 horas contra PBS en agitación suave, cambiando el buffer cada 12 horas aproximadamente. Las suspensiones de proteínas se liofilizaron y se guardaron a -20°C.

##### **4.2 Cuantificación de las proteínas de superficie extraídas**

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) en el cual las proteínas se unen al colorante Coomassie Blue G-250, lo que causa un cambio en el máximo de absorción de 465 nm a 595 nm y se monitorea este aumento en la absorción a 595 nm. Para realizar la curva de calibración se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar a partir de una solución de 1 mg/ml en PBS y diluciones de esta solución madre. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron por duplicado 20 µl de las soluciones de concentración desconocida de proteínas extraídas de la superficie bacteriana con 180 µl de reactivo de Bradford que es una solución del colorante en etanol, ácido fosfórico y agua el cual se preparó y filtró previamente. Se midió la absorbancia a 595 nm de cada muestra en lector de placas y se calculó la concentración de proteínas según  $[\text{concentración Proteína}] = F \times \text{DO}_{595}$  donde F es el factor obtenido de la curva de calibración, es decir la pendiente de la curva.

##### **4.3 Evaluación del perfil de proteínas de superficie extraídas**

El perfil de proteínas se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE al 7,5% según la técnica de Laemmli (1970). Para ello se preparó un gel de poliacrilamida y SDS como se detalla en el apéndice. Los extractos proteicos obtenidos en 4.1 fueron diluidos en buffer de buffer muestra al 50% v/v. Un volumen de 50 µl de cada muestra fue sembrada en el gel para su análisis. Se fijó el voltaje entre 50 y 70 volt cuidando que la corriente se mantenga entre 30 y 50 mA. Se fijó 30 minutos en solución de fijación 1 y 20 minutos dos veces en solución de fijación 2. El gel se coloreó con solución de Coomasie durante toda la noche. Para eliminar el exceso de colorante se hicieron lavados con agua destilada varias veces hasta que se visualizaron las bandas.

#### **4.4 Formación de biofilm de *S Enteritidis* 115 en presencia de proteínas superficiales de lactobacilos**

##### **4.4.1 Pre- incubación con proteínas de superficie de lactobacilos**

En placa de poliestireno de 24 pocillos se colocó en cada pocillo 1 ml de una suspensión de proteínas de superficie (0,1 mg/ml) extraídas de los lactobacilos según 4.1, y se dejó incubar 2 horas a 28°C en estufa. Transcurrido ese tiempo, se descartó el líquido y se lavaron las fosas 2 veces con 1 ml PBS. Sobre cada pocillo se agregó 1 ml de medio BHI y se inoculó al 1 % v/v con un cultivo de SE 115. Se dejó incubar durante 48 horas en estufa a 28°C y luego se determinó la cantidad de bacterias en biofilm por la técnica de recuento en placa como se describió anteriormente. Como control negativo, se reemplazaron los 500 µl de suspensiones de proteínas superficiales de lactobacilos por 500 µl de una suspensión de proteína albúmina (0,3 mg/ml). Este ensayo se realizó por duplicado en dos ensayos independientes.

##### **4.4.2 Co-incubación de proteínas superficiales de lactobacilos**

En placas de cultivo de 24 pocillos se colocó en cada pocillo 500 µl de medio LB 2X y 500 µl de suspensiones de proteínas superficiales (PS) de lactobacilos en PBS y se inocularon al 1 % v/v con un cultivo de SE 115. La placa se dejó incubar durante 48 horas en estufa a 28°C. Una vez transcurrida la incubación, la placa se lavó con PBS para eliminar aquellas bacterias que no se habían adherido a la superficie y las bacterias en biofilm se resuspendieron en 1 ml de PBS con ayuda de scrapper. Como control negativo se

reemplazaron los 500 µl de suspensiones de proteínas superficiales de lactobacilos por 500 µl de PBS o por 500 µl de una suspensión de proteína albúmina (0,3 mg/ml). Este ensayo se realizó por duplicado en dos ensayos independientes.

El biofilm formado fue evaluado por recuento de viables en placa de LB agar a 37°C durante 24 horas y por microscopia confocal laser luego de la tinción con Syto 9. Estas técnicas fueron descritas anteriormente (apartados 3.2.1 y 7 del Capítulo 1).

## **5. Efecto de *Lb kefir* 8321 y sus metabolitos sobre el fenotipo de SE 115**

### **5.1 Formación de la película en la interfaz aire- líquido**

#### **5.1.1 En tubo**

La formación de la película en la interfaz aire-líquido se determinó de la misma manera que en el punto 4 del Capítulo 1, pero en el medio de cultivo se resuspendió el pellet de un cultivo de *Lb kefir* 8321 obtenido en MRS a 30°C durante 48 horas y centrifugado a 7000 xg. La formación de la película se registró fotográficamente cada 24 horas durante 96 horas.

#### **5.1.2 Sobre porta objetos**

En tubo falcon de 50 ml se colocó un portaobjeto de vidrio y se agregaron 20 ml de medio de cultivo LB sin NaCl hasta cubrir la mitad del portaobjeto.

*Efecto de las bacterias:* Para estudiar el efecto de la presencia de *Lb kefir* 8321 se agregó una suspensión del lactobacilo previamente crecido en MRS a 30°C durante 48 horas, se centrifugó a 7000 xg y se resuspendió en LB sin NaCl.

*Efecto de los sobrenadantes:* Para estudiar el efecto del sobrenadante, se reemplazó la mitad del volumen de medio de cultivo por SNa o SNneu de *Lb kefir* 8321.

En ambos casos, se inocularon los tubos con un cultivo de SE 115 al 1% v/v. Se cerraron los tubos permitiendo el intercambio de gases y se dejaron incubar durante 48 horas en estufa a 28°C. Transcurrido el tiempo de incubación, los portaobjetos se retiraron del tubo y se lavaron con piseta de agua para eliminar las bacterias no adheridas. Las bacterias que se adherieron al vidrio se fijaron dejando secar en estufa durante 30 minutos. Para observar las bacterias, se tiñeron los vidrios con solución acuosa de cristal violeta al 0,2%

p/v durante 10 minutos. Se lavaron con agua dos veces para eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar al aire para observar al microscopio óptico.

### **5.2 Producción de curli y celulosa por morfotipo en rojo congo**

Para determinar el efecto de lactobacilos y sus metabolitos sobre la producción de curli y celulosa, el pellet de *Lb kefir* 8321, el SNa y SNneu se obtuvieron como en el punto anterior. Estos se agregaron a tubos con medio LB y se inoculó SE 115 al 1% v/v. Luego de 5 horas a 28°C se tomaron 10 µl y se sembraron en placas con agar LB rojo congo como se realizó en el punto 5 del Capítulo 1. El efecto sobre la morfología de las colonias se registró fotográficamente.

### **5.3 Producción de celulosa por morfotipo en calcoflúor**

Para determinar el efecto de lactobacilos y sus metabolitos sobre la producción de celulosa presente en la matriz del biofilm de *Salmonella* se inoculó 10 µl de las bacterias en placas de Petri con agar LB sin NaCl que contenían 200 µg/l de calcoflúor (fluorescent brightener 28, Sigma, Saint Louis, MO) y se incubó a 28°C durante 48 horas (Zogaj *et al.*, 2001). La producción de celulosa se evaluó mediante la comparación de la fluorescencia (bajo luz UV, 366 nm) de SE 115 control y la fluorescencia de Se 115 tratada 5 horas a 28°C con *Lb kefir* 8321 o su SNa y SNneu.

## **6. Efecto de *Lb kefir* no viable sobre la producción de curli y celulosa de SE 115**

### **6.1 Lactobacilo tratado con calor**

Un cultivo de *Lb kefir* 8321 crecido en MRS durante 48 horas a 30 °C se cosechó por centrifugación, se lavó 2 veces con PBS y finalmente se resuspendió en PBS. La suspensión así obtenida se trató a 75°C durante 30 minutos en baño termostatzado. Se tomaron 50 µl de esta suspensión y se co-incubaron con 50 µl de cultivo de SE 115 durante 5 horas a 28°C. Se tomaron 10 µl de la mezcla de ambas especies y se sembraron en placas de agar LB con rojo congo o calcoflúor como se explicó en el punto anterior.

### **6.2 Lactobacilo tratado con UV**

Un cultivo de *Lb kefir* 8321 crecido en MRS durante 48 horas a 30°C se centrifugó a 5000 xg y el pellet se lavó y se resuspendió en PBS. Esta suspensión se trató durante 30 minutos

en lámpara UV (ENG= 7,89 J/cm<sup>2</sup>, wav=254nm). Se tomaron 50 µl de esta suspensión y se co-incubaron con 50 µl de cultivo de SE 115 (DO=0,6) durante 5 horas 28°C. Se tomaron 10 µl y se sembraron en placas de agar LB con rojo congo o calcoflúor como se explicó en el punto anterior.

#### **7. Cuantificación relativa del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Tiempo Real (qRT-PCR) de genes asociados a la formación de biofilm de SE 115 en presencia de *Lb kefir* 8321**

La realización de qRT-PCR para semicuantificar y comparar los niveles de transcripto de los diferentes genes de interés en las cepas de estudio se realizó como se describe a continuación.

La extracción del material de partida se realizó a partir de las células en estado planctónico y del biofilm de la cepa SE 115 crecido en medio BHI durante 48 horas a 28°C en placa de 24 pocillos y en presencia o no de *Lb kefir* 8321. Luego de la incubación, se retiró el medio líquido, se lavaron las bacterias del biofilm con PBS y se recuperaron mediante raspado mecánico con scrapper. El pellet del material obtenido para iniciar la extracción fue resuspendido en 100 µl buffer Tris-EDTA estéril. Para la extracción de ARN de células bacterianas los pellets se lisaron con 10µl de lisozima (50mg/ml) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La extracción se realizó mediante el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Zymo Research, USA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se colocó un mililitro de reactivo de TRIzol® (ambion®, life technologies™, USA) y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cloroformo enfriado en baño de hielo por cada mililitro de TRIzol®, se vortexeó vigorosamente y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Las fases se separaron mediante centrifugación a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C y se recuperó la fase superior acuosa donde se encuentra el ARN, el cual se transfirió a un tubo limpio. Para precipitarlo, el ARN se mezcló con 0,5 ml de isopropanol frío por cada mililitro de TRIzol® empleado, dejando incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el

tiempo se centrifugó a 12000 xg 10 minutos a 4°C y el pellet obtenido se lavó con etanol 75% v/v y se dejó secar. El ARN obtenido se resuspendió en agua bidestilada (Rivero).

Para eliminar el ADN contaminante las muestras fueron incubadas y sometidas a digestión con DNAsa libre de ARNasa (1U/μg de ARN) (RNase-Free DNaseI, Epicentro Biotechnologies) durante 2 hs. a 37°C. Seguidamente se agregó a cada muestra DNAsa *Stop Solution* e incubó por 10 minutos a 65°C.

Luego de la inactivación de la DNAsa, la concentración y la pureza de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría midiendo la Abs260 nm y Abs280 nm empleando Nanodrop. Los valores de Abs a 280 nm indican la contaminación proteica de cada muestra dado que los residuos de tirosina y triptófano absorben fuertemente a esta longitud. La cantidad de ARN obtenida en la extracción es estimada mediante la siguiente relación: Abs a 260 nm DO = 1 equivale aproximadamente a 40μg/ml). Por lo tanto, la relación de Abs260 nm/Abs280 nm fue utilizada como indicadora de pureza de la muestra analizada aceptando las muestras como puras con una relación mayor de 1,6. Dado que cuantifica tanto ADN como ARN, se realizó un chequeo con gel de agarosa.

Para la obtención del molde, se empleó 1 μg de ARN antes obtenido a partir del cual se realizó la reacción de transcripción reversa. Para esto, el ADN complementario (ADNc) se sintetizó con hexámeros de *primers* generados al azar (*random hexamer primers*. Invitrogen), dNTPS y Transcriptasa Reversa M-MLV (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de ADNc fue confirmada por medio de PCR convencional con el uso de los *primers* que amplifican ARNr 16S. La polimerasa de *Thermus Aquaticus* del kit de Taq Pegasus (PB-L Productos Bio-lógicos®).

La qRT-PCR (del inglés *Quantitative-Real Time-Polimerase Chain Reaction*) se realizó mezclando el par de *primers* apropiados según el gen de interés cuya secuencia de nucleótidos se muestra abajo ADNc y Mezcla Real (Biodynamics), la cual contiene nucleótidos, polimerasa, *buffer* de reacción y colorante verde (*SYBR Green*), usando el termociclador detector Rotor-Gene 6000 Real Time PCR (Corbett Research) o termociclador detector Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. El ciclo de amplificación consistió de una fase mantenida por 10 min. a 95°C seguida de 40 ciclos a

95°C por 20 seg. 60°C por 30 seg. y 72°C por 20 seg. Al cabo del ciclado se desarrolló una curva de disociación que fue desde 65°C hasta 95°C con lecturas cada 0.3°C. Previo al análisis de la expresión relativa, se corroboró que las curvas de disociación tuvieran una única Temperatura de disociación o *Melting* ( $T_m$ ) para cada reacción de amplificación; es decir obtención de un único producto de amplificación, ausencia de formación de dímeros de *primers* o de contaminación, interferencias en la amplificación, etc. Para el análisis de la expresión génica relativa se aplicó el método comparativo de CT ( $\Delta CT$ ), siendo CT el número de ciclo al cual aparece la señal de fluorescencia (Livak y Schmittgen, 2001). El número de copias de cada muestra transcripta se determinó con la ayuda del *software* perteneciente al termociclador. Brevemente, primero se midió la eficiencia de amplificación para cada par de *primers* pertenecientes a los genes de interés y al gen establecido como *house keeping* (*gyrB*). Luego, se determinó el CT de cada muestra y se normalizó por la cantidad de templado agregado por comparación relativa al gen *house keeping* (control endógeno o normalizador). Estos valores ( $\Delta CT$ ), se normalizaron nuevamente a la muestra elegida como calibrador (de acuerdo a cada experimento) obteniéndose el valor de la expresión relativa ( $\Delta CT$ ). Por lo tanto, los resultados son relativos a la muestra del calibrador, al cual se le adjudica el valor de uno.

Para la determinación de niveles relativos de expresión de genes, en todos los casos, se desarrollaron experimentos independientes por triplicado. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de un ANOVA de un factor y/o por medio la prueba de “*t de Student*”.

La reacción de retrotranscripción se realizó utilizando el kit de la transcriptasa reversa RT M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase por sus siglas en inglés) según indicaciones del fabricante (Promega®). Se amplificaron los genes asociados a la formación de biofilm *csgD*, *csgA* y *bcsA* cuya secuencia de primers son (**F**: *primer* directo (*primer forward*); **R**: *primer* inverso (*primer reverse*):

**q-csgD F** GCCTCATATTAACGGCGTC

**q-csgD R** AGCGGTAATTCCTGAGTGC

**q-csgA F** AATGCCACCATCGACCAGTG

**q-csgA** R CAAAACCAACCTGACGCACC

**q-bcsA** F GCCCAGCTTCAGAATATCCA

**q-bcsA** R TGGAAGGGCAGAAAGTGAAT

Amplificación del gen *gyrB*

F CGGTAGTCAACGCTCTGTC

R GGCCAGAAACGTACCATCGT

## **Capítulo 4 – Lactobacilos y sus metabolitos sobre la capacidad formadora de biofilm de *Salmonella* en cáscara de huevo**

### **1. Desinfección de la superficie de huevos**

Para asegurar que la superficie a estudiar esté libre de microorganismos, se marcaron los huevos con lápiz (área de 1 cm<sup>2</sup>) y se desinfectaron sumergidos en solución de lavandina al 15% durante 5 minutos, luego se enjuagaron con agua estéril para sumergirlos en solución de formol al 40% durante 5 minutos (Samberg y Meroz, 1995). Por último, se sumergieron durante 5 minutos en solución de etanol al 70% v/v y se dejaron secar en cabina de flujo laminar. Una vez descontaminada, la superficie se cortó con bisturí en trozos de 1 cm<sup>2</sup>.

### **2. Formación de biofilm de *Salmonella* sobre cáscara de huevo**

#### **2.1 Recuento de viables**

Para la cuantificación de la formación de biofilm se utilizó el método descrito por Pande *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Los trozos de 1 cm<sup>2</sup> se colocaron en tubos conteniendo 10 ml de medio BHI y se inocularon con un cultivo de SE 115. Se incubaron en estufa durante 48 horas a 28°C. Luego se lavó la superficie del huevo dos veces con solución fisiológica estéril para desprender las bacterias no adheridas. El trozo de cáscara de huevo se colocó en un tubo falcon con 10 ml de triptona 0,1% p/v y perlas de vidrio previamente esterilizadas. El tubo se agitó suavemente con vortex durante 1 minuto y se

realizaron diluciones seriadas en triptona 0,1%. Se sembraron las diluciones en ágar LB y se dejaron incubar 18 horas en estufa a 37°C. Como control se utilizaron huevos desinfectados en medio sin inocular con cultivo de *Salmonella*.

## **2.2 Observación por microscopía electrónica de barrido**

Esta técnica fue utilizada para poder visualizar la formación de biofilm de *Salmonella* sobre esta superficie. Los trozos de 1 cm<sup>2</sup> se colocaron en tubos conteniendo 10 ml de medio BHI y se inocularon con un cultivo de SE 115. Se incubaron en estufa durante 48 horas a 28°C. Transcurrida la incubación, las cáscaras se lavaron con PBS para eliminar las bacterias no adheridas a la cáscara. La muestra se fijó con una solución de glutaraldehído al 4.0 % (Riedel de Haen, Seelze, Germany) en PBS durante un tiempo total de 24 horas a temperatura ambiente. Luego, se lavó nuevamente con PBS y se comenzó con la deshidratación. Para esto se prepararon soluciones de alcohol al 50, 60, 80 y 100 % en PBS. La muestra se dejó durante 15 minutos en las soluciones, comenzando con la solución al 50 % y continuando en concentraciones crecientes secuencialmente hasta la solución al 100 %. La deshidratación se realizó durante un tiempo total de 1 hora. Luego se secaron por punto crítico utilizando dióxido de carbono líquido para ir reemplazando el alcohol dentro de la cámara presurizada a 10°C. Las muestras se metalizaron con Au 24 y la observación se realizó en un microscopio electrónico de barrido ambiental (SEM) modelo FEI ESEM Quanta 200.

## **3. Efecto de los lactobacilos**

### **3.1 Pre-incubación con lactobacilos**

Las cáscaras de huevo (1 cm<sup>2</sup>) se colocaron en tubos conteniendo 10 ml medio MRS el cual se inoculó con lactobacilos *Lb plantarum* 83114, *Lb kefir* 83113 o *Lb kefir* 8321. Se incubaron durante 24 horas a 28°C para permitir la adhesión de los lactobacilos. Las cáscaras de huevo se lavaron con PBS y se pasaron a tubos conteniendo 10 ml de medio BHI y se inocularon con un cultivo de SE 115. Se incubaron en estufa a 28°C durante 48 horas y luego se lavaron con PBS estéril para desprender las células no adheridas. Las secciones de cáscaras se colocaron en tubos falcon con 10 ml de triptona al 0,1% y perlas

de vidrio. Se votexearon durante 1 minuto para desprender las células adheridas y se realizaron recuentos en agar LB y MRS para cuantificar *Salmonella* y lactobacilos respectivamente. Por otro lado, las cáscaras se utilizaron para la observación microscópica por la técnica de SEM como se describió en el punto 2.2.

### **3.2 Co-incubación con lactobacilos**

Las cáscaras de huevo de 1 cm<sup>2</sup> se colocaron en tubos con 10 ml de medio BHI el cual se inoculó al 1% con cultivos de lactobacilos *Lb plantarum* 83114, *Lb kefir* 83113 o *Lb kefir* 8321 y con SE 115 y se incubaron por 48 horas a 28°C. Luego se prosigió como en el ensayo anterior para poder determinar las bacterias viables en el biofilm y por microscopía electrónica de barrido para determinar los efectos sobre la estructura del biofilm. Como control se utilizó un tubo de BHI al cual se inoculó únicamente a 1% con el cultivo de SE 115. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

### **4. Efecto de los sobrenadantes de lactobacilos**

Para el estudio del efecto de los metabolitos presentes en los sobrenadantes, los cultivos de *Lb plantarum* 83114, *Lb kefir* 83113 o *Lb kefir* 8321 se centrifugaron a 7000 xg durante 10 minutos y los sobrenadantes se filtraron con filtro de 0,22 µm, obteniéndose así los sobrenadantes libres de células a pH de cosecha (SNa). Por otro lado, los sobrenadantes se neutralizaron con una solución de NaOH 5M hasta pH 7,0 obteniéndose sobrenadantes libres de células neutralizados (SNneu).

La mitad del volumen de medio de cultivo en los tubos conteniendo la cáscara de huevo se reemplazó por SNa o SNneu, para obtener una concentración del 50% v/v y se inocularon con SE 115. Se incubó durante 48 horas a 28°C y se realizaron recuentos de viables y SEM. Como control se utilizó medio MRS en lugar de sobrenadantes.

### **5. Efecto de las proteínas de superficie de *Lb kefir* 8321**

Las proteínas de superficie se obtuvieron como en el punto 4.1 del Capítulo 3. Se resuspendieron en medio BHI a una concentración de 0,1 mg/ml. Un trazo de 1 cm<sup>2</sup> se sumergió en un tubo conteniendo 10 ml de la suspensión de proteínas en BHI y se inoculó

con SE 115. Se incubó 48 hs a 28°C y se realizaron recuentos de viables y SEM en los puntos anteriores.

## **Anexo**

### **1. Ensayos en cultivos celulares**

Entre los diferentes mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden interaccionar con enterocitos, en *Salmonella* la adhesión y la invasión resultan ser los más relevantes como se mencionó anteriormente en la Introducción. Para diferenciar dichos mecanismos, es necesario poder distinguir entre las bacterias adheridas a las células y aquellas que son capaces de internalizarse e invadir. En este sentido, las bacterias adheridas deben enumerarse y luego eliminarse mediante la acción de un antibiótico que no afecte las células eucariotas, para poder determinar las células internalizadas. Es decir que se necesita conocer la sensibilidad de las bacterias al antibiótico que será utilizado. Para esto, debe determinarse la concentración bactericida mínima (CBM), es decir la mínima concentración del antibiótico a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano y se destruye el 99,9% de las bacterias en las condiciones estudiadas

#### **1.1 Células Caco- 2/TC7**

Como se comentó en la Introducción, la línea celular Caco-2/TC7 es un clon de la línea de epitelio intestinal de origen humano Caco-2. Es un modelo de estudio cuya principal ventaja es que presenta un tiempo de duplicación de 24 horas lo que le permite llegar a diferenciarse y estar en confluencia luego de 7 días. Se utilizaron células de la línea Caco-2-/TC7 entre los pasajes 30 a 40.

##### **1.1.1 Mantenimiento de las células**

Las células Caco-2/TC-7 se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido en viales conteniendo 1 ml de medio DMEM completo (ver Apéndice) con 10 % de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze, Alemania) como crioprotector. Para reactivarlas se descongeló un vial a 37 °C, se centrifugó a 1000 xg durante 10 min para remover el crioprotector, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco y se

colocaron en una botella de 25 cm<sup>2</sup> (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) con 4 ml de medio DMEM completo. El cultivo se mantuvo a 37 °C en estufa con atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>) renovando el medio cada 2 o 3 días. A los 7 días se obtuvo una monocapa confluyente y se repicó a una botella de 75 cm<sup>2</sup>. Antes de cada repique la monocapa se observó en un microscopio invertido para verificar su uniformidad y continuidad.

### **1.1.2 Tripsinado**

Para los repiques se descartó el medio agotado y se lavó la monocapa tres veces con PBS estéril, luego se colocaron 1,5 ml de solución de tripsina 0,25 % (Trypsin-EDTA, GIBCO, Life Technologies) y se llevó a la estufa gaseada a 37 °C durante 5 minutos aproximadamente hasta que se observó desprendimiento celular. Se agregaron 4 ml DMEM adicionado con suero fetal bovino, para inactivar la tripsina. La suspensión de células se centrifugó a 2000 xg durante 5 min, se descartó el medio y se reemplazó por medio DMEM fresco. Para realizar el recuento de células, se tomaron 50 µl de la suspensión y se mezclaron con igual volumen de una solución de azul tripán al 10 % en PBS en una cámara de Neubauer contando sólo aquellas células brillantes (viables). Se preparó una suspensión de 1,5 x 10<sup>5</sup> células/ml y se sembraron 0,5 ml por fosa en placas de 24 fosas (Greiner Bio-One). Las placas de cultivo celular se incubaron durante 7 días hasta su confluencia a 37 °C en una estufa con atmósfera controlada (5 % CO<sub>2</sub>) cambiando el medio cada 2 días.

### **1.2 Ensayo de asociación sobre células epiteliales en cultivo**

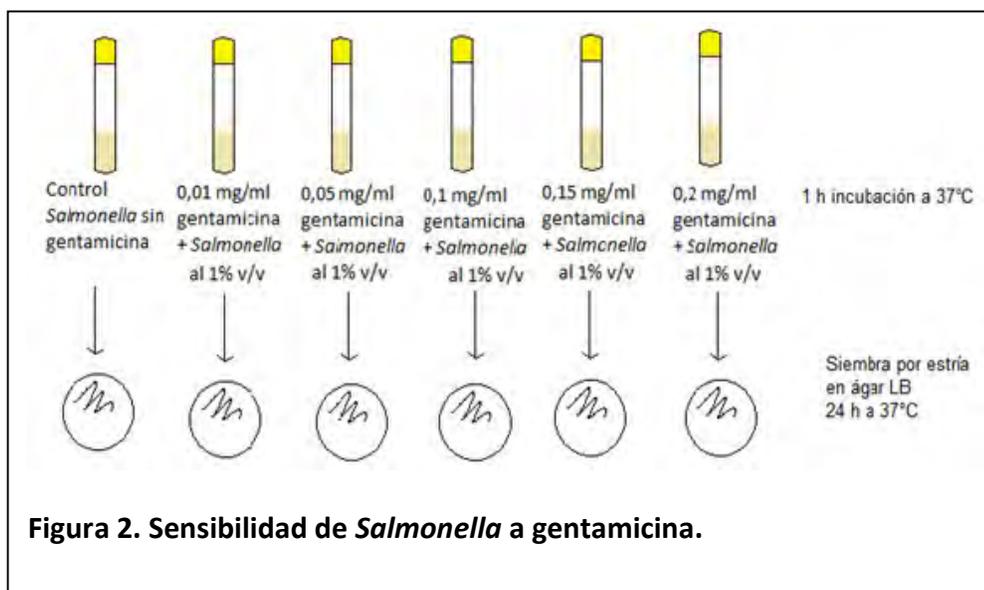
En una placa de 24 fosas se crecieron células de la línea intestinal Caco-2/TC7 hasta confluencia a 37°C en estufa gaseada. Se descartó el medio agotado y se lavó con PBS estéril. Se prepararon los cultivos de *Salmonella* en medio LB como se indicó en el punto 1, el cual se llevó hasta una concentración de 1 x 10<sup>8</sup> UFC/ml aproximadamente. Se centrifugó a 7000 x g durante 10 minutos y se resuspendió en igual volumen de DMEM de adhesión.

Para cuantificar la asociación de *Salmonella* se agregaron en cada fosa conteniendo la monocapa de células, 1 ml de suspensión de bacterias en DMEM sin suplementar y se incubó durante 1 hora en estufa gaseada a 37°C. Transcurrido el tiempo, las células se trataron con agua bidestilada estéril durante 1 hora a 37°C para desprender la monocapa,

lisar los enterocitos y liberar las bacterias. A partir de la suspensión de bacterias así obtenidas, se realizaron diluciones seriadas en triptona 0.1% y se sembraron en ágar LB para determinar las UFC/ml asociadas a las células. Se realizaron tres ensayos independientes, realizando duplicados para cada tratamiento.

## 2. Determinación de la sensibilidad de *Salmonella* a gentamicina

Se evaluó la sensibilidad al antibiótico gentamicina de las cepas de *Salmonella* SE 101, 105 y 115, ST 102 y SG 109. Para ello se resuspendieron 10 mg de gentamicina en polvo (*Parafarm*) en 1 ml de agua destilada con lo que se obtuvo la solución madre para luego probar distintas concentraciones de antibiótico. Se hicieron diluciones seriadas en medio LB, para obtener concentraciones finales de gentamicina de 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,15 mg/ml y 0,2 mg/ml. Los tubos conteniendo las diferentes concentraciones de antibióticos, se inocularon al 1 % v/v con cultivo de cada cepa de *Salmonella* a estudiar y se incubaron durante 1 hora a 37°C. De cada tubo se tomó una anzada y se sembró en estrías en placas de agar LB, las cuales se incubaron durante 24 horas a 37°C en estufa de cultivo. Se determinó la sensibilidad como la concentración de antibiótico a la cual no se observó desarrollo de colonias en las placas de cultivo.



### **3. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de los sobrenadantes de lactobacilos**

Se estudió la CIM de los sobrenadantes de lactobacilos a pH de cosecha (SNa) sobre el crecimiento de SE 115. Los SNa de *Lb plantarum* 83114, *Lb kefir* 8321 y *Lb delbrueckii sub lactis* 133 se obtuvieron como se indicó en el punto 3.1 del Capítulo 3. En tubo con medio BHI y concentraciones crecientes de SNa se inoculó con cultivo de SE 115 al 1% v/v y se incubaron durante 24 horas a 37°C. La no aparición de turbidez en el medio de cultivo se tomó como inhibitorio del crecimiento. El estudio se realizó por triplicado.

### **4. Formación de biofilm de *Salmonella* co-incubada con *Lb kefir* 8321 conservadas**

Se estudió el efecto sobre la capacidad formadora de biofilm de *Salmonella* mediante la co-incubación con la cepa de *Lb. kefir* 8321 deshidratada por secado en spray o liofilización, como métodos de conservación ampliamente estudiados para bacterias lácticas.

#### **4.1 Secado en spray de lactobacilos**

Para estudiar el efecto del lactobacilo previamente secado por spray sobre la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella*, un cultivo de *Lb kefir* 8321 crecido en MRS se centrifugó a 7000 x g y se resuspendió en solución de maltodextrina al 20%. La suspensión de lactobacilos se secó en secador Buchi Mini spray dryer B290. Las condiciones de secado fueron: temperatura de salida 75°C (velocidad de flujo 20.9 ml/minuto), temperatura de entrada 180°C y presión 5 Bar. Los microorganismos deshidratados fueron recolectados en un recipiente estéril y fueron almacenados a -20°C en tubos de plástico para su posterior utilización. Se estudió la viabilidad de los lactobacilos en el polvo obtenido mediante recuento de UFC en ágar MRS a 30°C.

En el estudio del efecto sobre la formación de biofilm de *Salmonella*, se resuspendió el polvo obtenido en medio LB hasta una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml, se inoculó al 1% v/v con un cultivo de *Salmonella* en placa de 24 pocillos y se incubó durante 48 horas a 28°C. Se determinó la cantidad de bacterias formadoras de biofilm por recuento de viables en agar LB a 37°C.

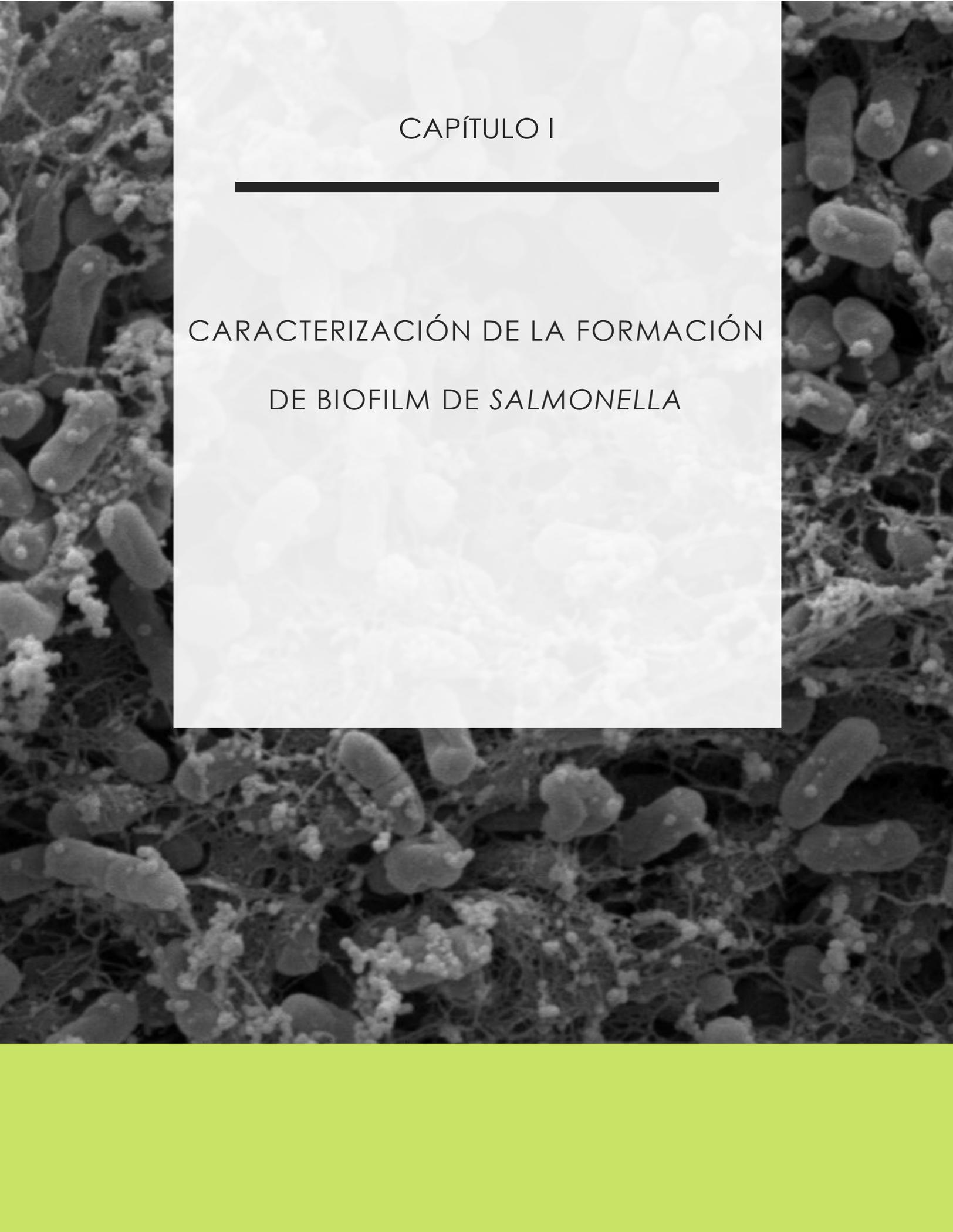
#### **4.2 liofilización de lactobacilos**

En este caso el pellet de 100 ml de un cultivo de *Lb kefir* 8321 crecido en las condiciones habituales se resuspendió en 100 ml de D(+)-sacarosa 250 mM en PBS. Esta suspensión se llevó a freezer de -80 °C y luego se deshidrató utilizando un liofilizador Heto FD4. El polvo obtenido se mantuvo a -20°C para su posterior utilización. La viabilidad del lactobacilo se determinó por recuento en ágar MRS a 30°C, resuspendiendo 0,1 g de polvo en 900 µl de triptona 0,1 % p/v sembrando las diluciones correspondientes.

Para los ensayos del efecto sobre la capacidad formadora de biofilm de *Salmonella*, el polvo obtenido se resuspendió en medio LB y se prosiguió como en el caso anterior.

### **5. Análisis estadístico**

Todos los resultados obtenidos en la tesis son el promedio de experimentos realizados por duplicado, triplicado o cuadruplicado. Se informaron los resultados como medias y desvíos estándar. Las diferencias significativas entre promedios se calcularon por el modelo ANOVA (análisis de varianza) y test de Tukey. Se consideraron diferencias significativas los valores de  $p \leq 0,05$ . Para estos propósitos se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California).

A scanning electron micrograph (SEM) showing a dense network of Salmonella bacteria. The bacteria are rod-shaped and interconnected by a complex, fibrous extracellular matrix, characteristic of a biofilm. The image is in grayscale and occupies the background of the page.

# CAPÍTULO I

---

## CARACTERIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM DE SALMONELLA



# CAPÍTULO 1

## Caracterización de la formación de biofilm por *Salmonella*

Como se ha descrito en el capítulo introductorio, *Salmonella* tiene la capacidad de formar biofilm en superficies ampliamente extendidas en granjas avícolas tales como bebederos, tanques, mesadas, botas de trabajo, etcétera. Esta capacidad está relacionada con la expresión de genes específicos en *Salmonella*, que determinan entre otras cosas, propiedades superficiales de la bacteria. Existen estudios de autoagregación e hidrofobicidad que permiten aproximar la capacidad de formación de biofilm ya que éstas pueden determinar la fijación a superficies compatibles y la interacción con otras bacterias de su misma especie o diferente.

La adhesión bacteriana a superficies puede depender tanto de la hidrofobicidad como de la capacidad de autoagregar de las bacterias (Sorongon *et al.*, 1991). En este sentido, evaluar dichas propiedades superficiales sobre las cepas de *Salmonella* en estudio nos podría permitir obtener una aproximación sobre la capacidad de *Salmonella* de adherirse a superficies. Por otro lado, el estudio de la producción de estructuras poliméricas que forman parte de la matriz, como fimbrias curli y celulosa nos podrían permitir caracterizar la capacidad de las cepas de formar biofilm.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos sobre el estudio de propiedades de superficie de 16 cepas de *Salmonella enterica* de distintas serovariedades, aisladas principalmente de granjas avícolas de nuestra región, su capacidad de formación de biofilm en distintas condiciones de cultivo y la relación entre la hidrofobicidad y la autoagregación.

## Objetivos

- Caracterizar 16 cepas de *Salmonella* en cuanto a su capacidad de autoagregación y la hidrofobicidad.
- Evaluar la capacidad de formación biofilm de *Salmonella* en distintas condiciones de cultivo y sobre distintas superficies presentes en la industria aviar y caracterizar componentes principales de la matriz extracelular.
- Establecer si existe una relación entre las propiedades superficiales y la formación de biofilm.



# Resultados y discusión

## 1. Estudios de propiedades superficiales de *Salmonella*

### 1.1 Autoagregación

En la autoagregación, las bacterias interactúan físicamente entre ellas formando clústers que sedimentan al fondo en una suspensión estática (Nikitina *et al.*, 2001; Sorroche *et al.*, 2010). Una manera de cuantificar la capacidad de formar estos clusters bacterianos es monitorear la sedimentación espontánea de una suspensión bacteriana inmóvil mediante la medida del cambio en la  $DO_{600}$ . En aquellas bacterias con capacidad de autoagregar, se observará una disminución de la turbidez o caída de la  $DO_{600}$  en el tiempo.

Por lo tanto, para estudiar la capacidad de autoagregación de las cepas de *Salmonella* se midió la caída de la turbidez de las suspensiones luego de 1 y 20 horas como se describió en materiales y métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.1.

Cepa <i>Salmonella</i>	%Autoagregación	
	t=1 hora	t=20 horas
SE 101	1,4 ± 2,4 <sup>a</sup>	31,8 ± 0,8 <sup>a</sup>
SE 105	4,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	30,5 ± 0,7 <sup>a</sup>
SE 106	9,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	54,1 ± 0,7 <sup>d</sup>
SE 107	4,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	29,3 ± 2,0 <sup>a</sup>
SE 112	2,3 ± 3,8 <sup>a</sup>	27,9 ± 3,3 <sup>a</sup>
SE 113	3,7 ± 1,8 <sup>a</sup>	27,7 ± 2,2 <sup>a</sup>
SE 114	2,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	28,8 ± 0,3 <sup>a</sup>
SE 115	0,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	34,3 ± 3,1 <sup>a</sup>
SE 116	1,1 ± 5,7 <sup>a</sup>	32,5 ± 0,5 <sup>a</sup>
ST 102	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	45,2 ± 4,3 <sup>b</sup>
ST 103	5,2 ± 1,3 <sup>a</sup>	33,9 ± 7,4 <sup>b</sup>
ST 108	7,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	42,4 ± 3,6 <sup>b</sup>
SG 104	4,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	28,1 ± 6,7 <sup>a</sup>
SG 109	1,0 ± 1,9 <sup>a</sup>	26,0 ± 1,3 <sup>a</sup>
SG 110	16,2 ± 3,9 <sup>c</sup>	16,2 ± 0,8 <sup>c</sup>
SG 111	2,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	28,4 ± 6,3 <sup>a</sup>

**Tabla 1.1 Porcentajes de autoagregación de cepas de *Salmonella* medida a 1 hr y 20 hs**  
 Los valores mostrados representan el porcentaje de autoagregación promedio y su desviación estándar obtenidos de tres ensayos independientes. SE: *Salmonella* Enteritidis; ST: *Salmonella* Typhimurium; SG: *Salmonella* Gallinarum Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas de *Salmonella* a un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).

Los resultados mostraron que catorce de las dieciséis cepas estudiadas presentaron porcentaje de autoagregación por debajo de 7% luego de 1 hora, excepto las cepas SE 106 y SG 110 que mostraron valores por encima de 9%. A las 20 horas, se obtuvieron porcentajes de autoagregación considerablemente mayores para todas las cepas ensayadas, que variaron entre 16% y 54%, siendo el comportamiento cepa-dependiente. Las cepas SE 106, ST 102, 103 y 108 mostraron valores de autoagregación significativamente mayores respecto del resto de las cepas ensayadas, siendo SE 106 la que resultó más autoagregante a las 20 hs. El porcentaje de autoagregación de la cepa SG 110 se mantuvo luego de 20 horas, siendo la cepa menos autoagregante en este tiempo. Las cepas de *Salmonella* Typhimurium alcanzaron porcentajes de autoagregación entre 34 y

45% en este tiempo, aunque estas diferencias no resultaron significativas entre las cepas de esta serovariedad.

Otros autores han estudiado la autoagregación de *Salmonella* encontrando una alta variabilidad. Beshiru *et al.* (2018) estudiaron la autoagregación de 12 cepas de *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium y otras serovariedades, encontrando que el porcentaje de autoagregación de estas cepas fue entre 15 y 47%. Por otro lado, Wang *et al.* (2013) determinaron el porcentaje de autoagregación de *Salmonella enterica* serovariedades Heidelberg, Derby, Agona, Indiana, Infantis y Typhimurium encontrando una alta variabilidad entre ellas, obteniendo valores desde 5% hasta 80% de autoagregación. Esta dispersión puede ser resultado de variaciones específicas de la superficie celular entre serotipos, en particular diferentes proteínas de superficie, que han sido consideradas mediadoras en el proceso de agregación y pueden conferir ventajas para la supervivencia en el ambiente (Poimenidou *et al.*, 2009).

La autoagregación se ha relacionado con la formación de biofilm ya que en este modo de crecimiento las bacterias se desarrollan adheridas a una superficie, viva o inerte, y está mediado por la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (Rinaudi *et al.*, 2010). Estas estructuras agregativas como flagelos, apéndices de superficie y polisacáridos juegan un papel importante en este proceso (Van Houdt y Michiels, 2009). Se ha demostrado que tanto componentes extracelulares como superficiales de las bacterias tales como exopolisacáridos, lipopolisacáridos, flagelos, y moléculas señales del *quorum sensing* y del ambiente están involucrados en los fenómenos de autoagregación, co-agregación, formación de biofilm y colonización del huésped (Nocelli *et al.*, 2016). La complejidad fisiológica y estructural de los biofilms ha revelado que estos grupos de bacterias tienen un desarrollo cooperativo y altamente coordinado, mediante la co-expresión de celulosa y fimbrias curli las cuales están involucradas en fenómenos de agregación bacteriana y adhesión a superficies (Anriany *et al.*, 2006; Jonas *et al.*, 2007). Se ha reportado que *Salmonella* produce estructuras de superficie celular como carbohidratos y proteínas involucradas en la autoagregación bacteriana que pueden resultar en comunidades

bacterianas que, dependiendo de las condiciones ambientales, pueden dar lugar a la formación de biofilms (Knowles *et al.*, 2005).

## **1.2 Hidrofobicidad**

Aunque la adhesión de bacterias a superficies involucra múltiples factores, la hidrofobicidad superficial es un parámetro que nos podría brindar información relevante en cuanto la capacidad de un microorganismo de adherirse a un sustrato (Wadström, 1990; Silva-Dias *et al.*, 2015). Existen tanto factores externos, como la temperatura, el tiempo, pH y la fuerza iónica, como factores propios de la superficie bacteriana que influyen en ésta propiedad y por lo tanto están relacionadas con la adhesión (Vatsos *et al.*, 2001).

A los efectos de caracterizar las cepas de *Salmonella* se evaluó su hidrofobicidad superficial utilizando el método MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbons). Por su simplicidad y reproducibilidad, el método utilizado para medir la hidrofobicidad es la medida de la partición de una suspensión bacteriana en un hidrocarburo, tal como el hexadecano o xileno, mediante el cambio en el valor de la DO en fase acuosa (Ofek y Doyle, 1994; Bellom-Fontaine *et al.*, 1996; Collado *et al.*, 2008). De esta manera, si un microorganismo posee una elevada hidrofobicidad y migra a la fase orgánica no polar, se evidencia una caída en la DO medida en la fase acuosa. Ambos se han utilizado ampliamente en la determinación de la hidrofobicidad superficial y su correlación con otras propiedades de superficie como la agregación y la adhesión bacteriana (Béchet y Blondeau, 2003; Jacobs *et al.*, 2009; Andrews *et al.*, 2010; Palmer *et al.*, 2015; Lou *et al.*, 2017; Bohinc *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2018).

Los resultados de hidrofobicidad obtenidos para las cepas de *Salmonella* en ambos solventes se muestran en la Tabla 1.2.

Cepas de <i>Salmonella</i>	%Hidrofobicidad	
	Hexadecano	Xileno
SE 101	2,2 ± 3,1	2,5 ± 1,0
SE 105	5,0 ± 3,2	2,1 ± 1,1
SE 106	3,9 ± 0,8	1,6 ± 1,5
SE 107	2,0 ± 1,7	1,2 ± 1,1
SE 112	28,3 ± 0,3	27,5 ± 1,6
SE 113	24,8 ± 0,5	20,6 ± 1,0
SE 114	36,8 ± 2,1	31,1 ± 5,8
SE 115	36,6 ± 3,5 <sup>a</sup>	44,3 ± 7,3 <sup>b</sup>
SE 116	40,5 ± 5,7	41,6 ± 7,2
ST 102	6,1 ± 6,2	2,7 ± 1,0
ST 103	1,0 ± 4,3	6,4 ± 0,2
ST 108	10,0 ± 5,1	7,2 ± 5,0
SG 104	2,5 ± 1,5	1,9 ± 2,6
SG 109	3,8 ± 1,0	1,4 ± 0,2
SG 110	1,8 ± 1,2	1,6 ± 1,5
SG 111	1,1 ± 1,5	6,8 ± 1,7

**Tabla 1.2 Hidrofobicidad superficial de cepas de *Salmonella* medido por método MATH empleando hexadecano y xileno.** Los valores mostrados corresponden al promedio de duplicados en tres ensayos independientes y sus desviaciones estándar; diferencias significativas entre ambos solventes se indicaron con letras diferentes ( $p < 0,05$ ).

Las cepas se clasificaron en altamente hidrofóbica ( $\geq 50\%$ ), moderada (de 20 a 50%) e hidrofílica ( $\leq 20\%$ ) según la clasificación hecha por Di Bonaventura *et al.* (2008).

Como se observa en la tabla, ninguna de las cepas evaluadas superó el 50% de hidrofobicidad superficial, por lo que ninguna resultó altamente hidrofóbica. Las cepas SE 112, 113, 114, 115 y 116 fueron las que presentaron un porcentaje de hidrofobicidad superficial mayor al 20%, es decir fueron moderadamente hidrofóbicas, siendo las dos últimas las que presentaron la mayor hidrofobicidad superficial. El resto de las cepas estudiadas fueron hidrofílicas. Cabe destacar que las únicas cepas con hidrofobicidad moderada pertenecen a la serovariedad Enteritidis mientras que las serovariedades Typhimutium y Gallinarum fueron todas hidrofílicas.

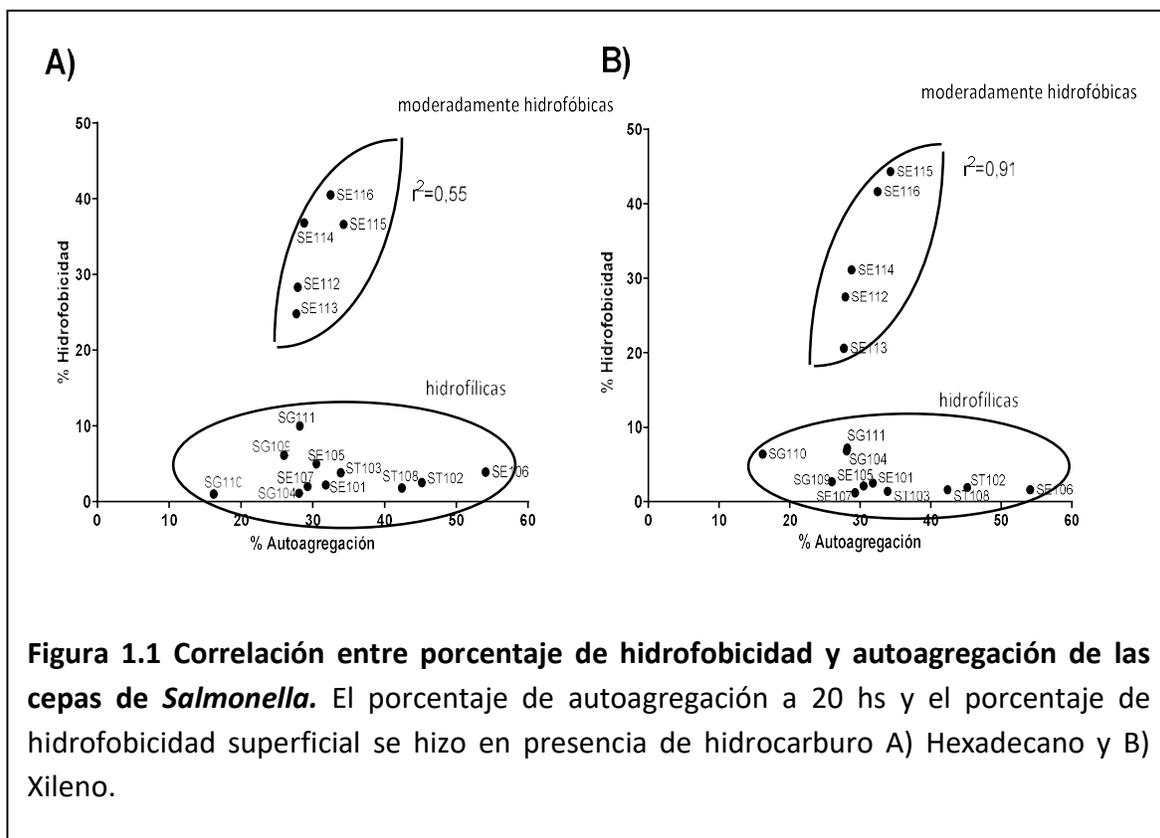
Otros autores encontraron diferencias entre la hidrofobicidad medida con ambos solventes. Chia *et al.* (2008) encontraron que 12 de 25 cepas de *Salmonella enterica* de diferentes serovariedades fueron hidrofóbicas en xileno mientras que todas las cepas resultaron hidrofílicas en hexadecano. Los autores proponen que distintos solventes caracterizarían aspectos de la superficie diferentes.

Debe tenerse en cuenta que el método MATH está afectado por varios factores tales como el tipo de hidrocarburo utilizado, la viscosidad del mismo o el tamaño de las gotas formados durante el mezclado (Dillon *et al.*, 1986). Otros factores como los procedimientos de manipulación de los cultivos también pueden afectar la superficie celular (Pembrey *et al.*, 1999). El hexadecano (n-hexadecano) es un hidrocarburo alifático de cadena larga, cuya fórmula química es  $C_{16}H_{34}$ . Los alcanos, debido a su baja polaridad, se disuelven en disolventes de baja polaridad o no polares y no son solubles en solventes polares como el agua. El xileno es un derivado dimetilado del benceno cuya fórmula química es  $C_8H_{10}$ . Por su baja polaridad (constante dieléctrica a  $20^{\circ}C = 0,62$ ), es insoluble en agua y soluble en alcohol, éter y otros solventes orgánicos.

Nuestros resultados demuestran que el porcentaje de hidrofobicidad superficial no depende de la fase orgánica utilizada ya que, excepto para la cepa SE 115, no se observaron diferencias significativas entre ambos solventes. En la mayoría de los casos, los valores de hidrofobicidad obtenidos con hexadecano fueron levemente mayores a los obtenidos con xileno.

### **1.3 Relación entre la autoagregación y la hidrofobicidad superficial**

Al graficar la relación entre porcentaje de hidrofobicidad y autoagregación encontramos que las cepas de *Salmonella* estudiadas pueden dividirse en dos grupos. Las cepas que resultaron con moderada hidrofobicidad mostraron una buena correlación con la autoagregación, pero no se observó esto para las cepas hidrofílicas (Figura 1.1).



Las cepas que tienen una hidrofobicidad moderada presentan valores de autoagregación entre el 28% y el 34%, mientras que las cepas hidrofílicas presentan un rango de autoagregación entre 16% y 54%. En particular, la cepa SE 106 tuvo la mayor capacidad de autoagregación (54%) y presentó una superficie altamente hidrofílica. El análisis de correlación ( $r^2$ ) cuando solo se consideran las cepas hidrofóbicas, arrojó un coeficiente de 0,55 para el solvente hexadecano y de 0,91 para xileno, indicando que en estos casos existe una correlación positiva y que en xileno la correlación fue mayor. Sin embargo, esto no se extiende al resto de las cepas que fueron hidrofílicas.

Collado *et al.* (2008) estudiaron la relación entre las propiedades superficiales de bacterias patógenas y probióticas en cuanto a su capacidad de autoagregar y la hidrofobicidad superficial por partición en xileno. En este estudio, no se observó una correlación entre estas propiedades para las cepas patógenas, entre ellas *Salmonella* Typhimurium, mientras que se demostró una correlación positiva para las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En otro estudio, Rahman *et al.* (2008) encontraron que cepas

autoagregantes de *Bifidobacterium* mostraron altos valores de hidrofobicidad superficial, mientras que las cepas moderadas y poco autoagregantes mostraron heterogeneidad en cuanto a los valores de hidrofobicidad, concluyendo que la hidrofobicidad es uno de los factores determinantes de la autoagregación y que otras características superficiales y ambientales intervienen en dicho proceso. Se ha demostrado que las proteínas de capa S tienen un rol importante en la hidrofobicidad y en la adhesión de las bacterias a una superficie (Smit *et al.*, 2001; Van der Mei *et al.*, 2003).

Varios autores han reportado una relación entre la autoagregación y la capacidad de adhesión (Del Re *et al.*, 1998, 2000; Pérez *et al.*, 1998) y la hidrofobicidad y adhesión de la superficie (Wadstrom *et al.*, 1987; Marin *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 2006). En este trabajo se evaluó la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* como se muestra en la siguiente sección.

## **2. Capacidad de formación de biofilm de *Salmonella***

Muchos estudios demuestran que *Salmonella* puede adherirse sobre alimentos (Iturriaga *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2015) y superficies presentes en la industria alimentaria (Otta y Karunasagar, 2001; Wang *et al.*, 2013). Una vez adherida, *Salmonella* puede producir fimbrias curli y celulosa con capacidades agregativas que son indicadores significativos de la formación de biofilms. Para evaluar la formación de biofilm de las cepas de *Salmonella* existen diferentes metodologías y el uso de cada una de ellas nos permiten evidenciar diferentes estructuras implicadas en este proceso.

### **2.1 Formación de biofilm de *Salmonella* en placa multipocillos**

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de las cepas de *Salmonella* de diferentes serovariedades en distintas condiciones de crecimiento. Para evidenciar y cuantificar el crecimiento en biofilm, las cepas de *Salmonella* se incubaron en placa de 24 pocillos como se indicó en materiales y métodos. Para su cuantificación se empleó la técnica de tinción con cristal violeta y posterior análisis mediante espectrofotometría. Esta es una metodología ampliamente utilizada y nos permite hacer un análisis simple y

rápido de la capacidad de formar biofilm en una amplia variedad de condiciones de cultivo (Romling y Rohde, 1999; Joseph *et al.*, 2001; Djordjevic *et al.*, 2002; Stepanović *et al.*, 2003; Pui *et al.*, 2011; Agarwal *et al.*, 2011).

### **2.1.1 En diferentes condiciones de crecimiento**

En esta parte del trabajo se determinó la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* variando la temperatura, el tiempo de incubación y la concentración del medio de cultivo. Se sabe que la temperatura tiene una influencia marcada en la formación de biofilm (Stepanović *et al.*, 2002) por lo tanto se seleccionaron tres temperaturas para evaluar el efecto sobre el biofilm de *Salmonella*: 37°C que es la temperatura óptima de crecimiento de *Salmonella* (Gast, 2008), 28°C que es la temperatura para la expresión de los componentes de la matriz extracelular (Steenackers *et al.*, 2012) y 20°C que es una temperatura que podría representar el ambiente en granjas avícolas (Kocaman *et al.*, 2006).

Además, la formación de biofilm es afectada por la composición del medio de cultivo en el cual se crecen las bacterias (Speranza *et al.*, 2011). La formación y adherencia del biofilm no ocurre por el mismo mecanismo en los diferentes medios. Las cepas utilizan diferentes estrategias y expresan diferentes genes promotores de biofilm en función de los recursos ambientales disponibles. Las estructuras superficiales, es decir, proteínas y otras moléculas con propiedades adhesivas, así como factores que simplemente contribuyen a la hidrofobicidad/hidrofilicidad de la superficie celular, podrían expresarse de manera muy diferente según el medio de crecimiento influyendo en las propiedades de adherencia de la cepa (Hancock *et al.*, 2011). Se ha demostrado que algunas cepas de *Salmonella* pueden formar biofilm en medio diluido (Solano *et al.*, 2002; Paytubi *et al.*, 2017). Castelijijn *et al.* (2012) reportaron que cepas de *Salmonella* aisladas de industrias alimentarias forman densos biofilms en medio diluido 1/20 a 25°C. De esta manera, se evaluó la formación de biofilm de *Salmonella* en medio LB sin diluir (1X) y medio LB diluido 20 veces (0.05X).

Para poder clasificar las cepas de *Salmonella* según su capacidad de formar biofilm en las distintas condiciones mencionadas, se utilizó el criterio definido por Stepanovic *et al.* (2004) donde el valor de densidad óptica a 595 nm (DO) de corte (DOcorte) se definió

como 3 desviaciones estándar por encima de promedio de DO del control negativo (medio sin inocular). Según este criterio, las cepas se clasificaron como:

$DO \leq DO_{corte}$  = NO FORMA

$DO_{corte} < DO \leq 2 \times DO_{corte}$  = DÉBIL

$2 \times DO_{corte} < DO \leq 4 \times DO_{corte}$  = MODERADA

$4 \times DO_{corte} < DO$  = FUERTE

Los resultados de la formación de biofilm de *Salmonella* en distintas condiciones se presentan en la Tabla 1.3.

Cepa de <i>Salmonella</i>	24 h 20°C		48 h 20°C		24 h 28°C		48 h 28°C		24 h 37°C		48 h 37°C	
	LB	LB 1/20										
<b>SE 101</b>	++	+++	++	+++	+++	+	++	+	++	-	+	-
<b>SE 105</b>	+	++	++	++	++	-	++	+	+	-	++	+
<b>SE 106</b>	+	+++	+	++	-	++	-	++	-	+++	+	+++
<b>SE 107</b>	+	+	-	++	-	-	+	-	+	-	+	-
<b>SE 112</b>	+	+	-	++	-	+	+	+	+	-	-	-
<b>SE 113</b>	+	+	+	++	++	-	-	-	+	-	-	-
<b>SE 114</b>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<b>SE 115</b>	+++	++	+++	++	+++	+	+++	+	+++	-	+++	+
<b>SE 116</b>	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	++	-
<b>ST 102</b>	++	++	+	+++	+	-	-	-	-	-	+	-
<b>ST 103</b>	+	++	+	++	-	+	+	+	+	-	+	+
<b>SG 104</b>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
<b>ST 108</b>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
<b>SG 109</b>	+	+	-	-	++	+	+	+	-	-	+	-
<b>SG 110</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SG 111</b>	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 1.3 Capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* en diferentes condiciones de crecimiento.** Los valores se expresaron como: (-) no forma, (+) débil, (++) moderada, (+++) fuerte formadora. En amarillo se resaltaron las cepas que mostraron fuerte formación de biofilm en algunas de las condiciones evaluadas

Como se observa en la Tabla, las cepas SE 101, 106 y 115 mostraron fuerte y moderada capacidad de formación de biofilm en varias condiciones de cultivo, a diferentes temperaturas y concentración del medio de cultivo (resaltadas en la Tabla 1.3), siendo SE 115 la cepa que presentó fuerte formación de biofilm en la mayoría de las condiciones evaluadas. La cepa ST 102 sólo resultó fuerte o moderada formadora de biofilm a 20°C. Por otro lado, las cepas de SG, ST 103 y 108 y SE 107, 112, 113, 114 y 116, fueron principalmente no formadoras o débilmente formadoras de biofilm.

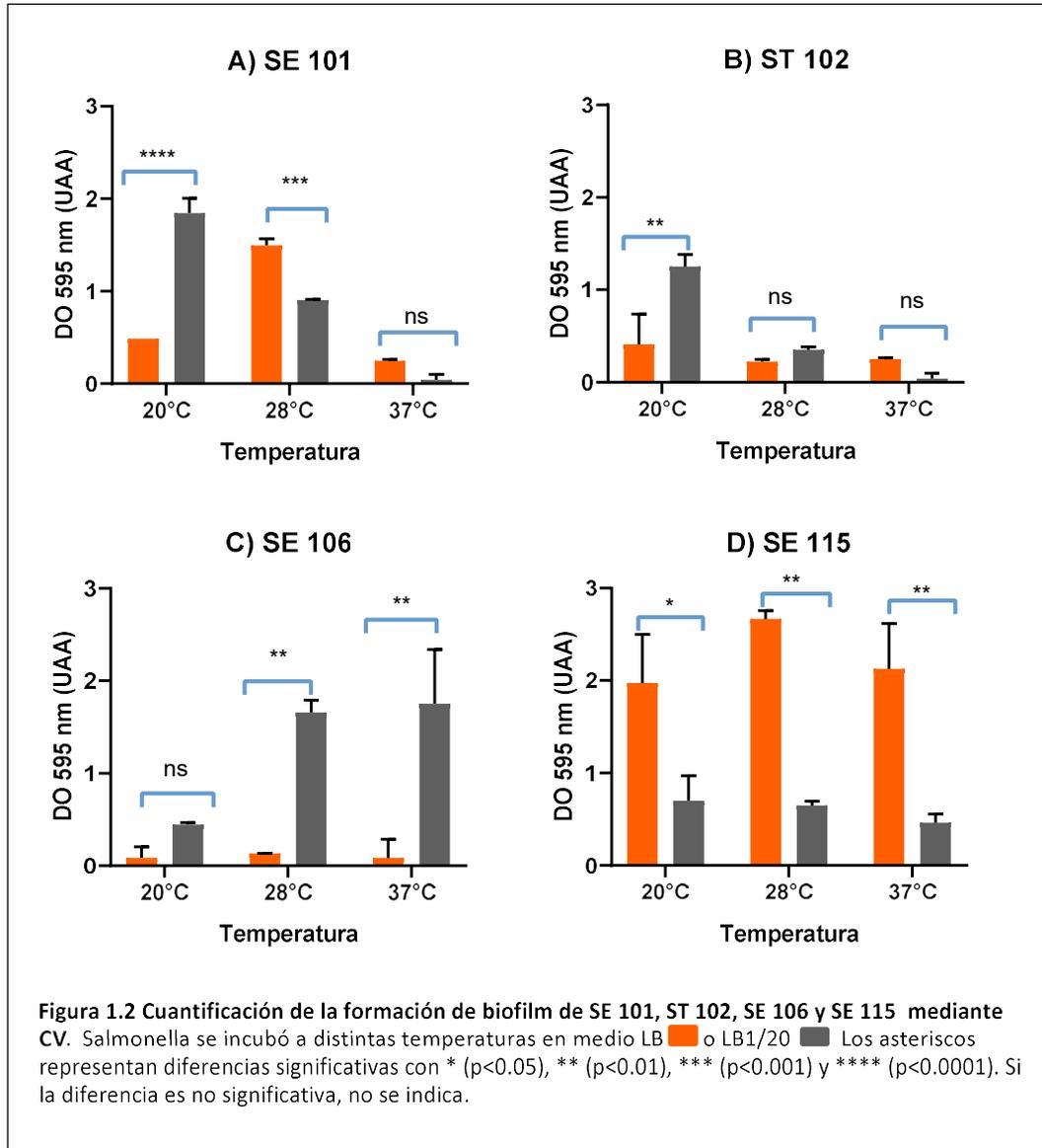
Como se observa en la Tabla 1.3, todas las cepas fueron capaces de producir biofilm a 20°C luego de 24 horas, mientras que algunas cepas forman un biofilm que se desprende luego de 48 horas, posiblemente debido al agotamiento de nutrientes. Cuando la temperatura de cultivo fue de 28°C, se favoreció la formación de biofilm de las cepas SE 101, 105, 113 y 115, ST 102 y SG 109 en medio rico en nutrientes (LB). Excepto SE 101, 106 y 115 las cepas no forman biofilm a 37°C. Se observó un marcado efecto de la composición del medio de cultivo sobre la formación de biofilm. Solo la cepa SE 106 resultó fuerte formadora de biofilm en medio diluido a las tres temperaturas evaluadas.

Castelijjn *et al.* (2012) estudiaron la formación de biofilm de 51 cepas de *Salmonella* encontrado cepas formadoras en el medio rico en nutrientes, cepas que sólo formaron biofilm en medio diluido 1/20 y otras no formaron biofilm en ningún medio y lo relacionaron los con una inducción de características específicas que están ausentes o no inducidas en las cepas no formadoras. Paytubi *et al.* (2017) demostraron que cuando *Salmonella* crece en medio mínimo cambia la formación de biofilm a través de un aumento en la transcripción de *csgD* y por lo tanto de la producción de los componentes de la matriz extracelular. Esto sugiere que las condiciones fisiológicas y, por lo tanto, las condiciones ambientales, definen el tipo de biofilm que forma *Salmonella*.

Estos resultados indican que la formación de biofilms de *Salmonella* no solo depende de las condiciones ambientales sino también es particular de cada cepa. Sin embargo, ninguna de las cepas de *Salmonella* Gallinarum resultó fuerte formadora de biofilm en las condiciones estudiada. Agarwal *et al.* (2011) evaluaron 151 cepas de *Salmonella* de 69 serotipos diferentes las cuales 29, 87 y 34 cepas fueron clasificadas como fuerte,

moderadas o débiles formadoras de biofilm respectivamente, evidenciando el carácter cepa-dependiente de esa propiedad. Sin embargo, dicha capacidad no pudo ser relacionada con el serotipo. Similares resultados fueron encontrados por Oliveira *et al.* (2007), Díez-García *et al.* (2012) y Lianou y Koutsoumanis (2012). Aunque las condiciones de estudio fueron diferentes y resulta difícil comparar resultados, no se ha encontrado una relación entre la habilidad de formar biofilm y el serotipo de *Salmonella*.

Para realizar un análisis cuantitativo, se seleccionaron las cepas de *Salmonella* que presentaron fuerte capacidad de formación de biofilm a distintas temperaturas de incubación y los valores de DO<sub>595</sub> obtenidos se graficaron en la Figura 1.2 como unidades arbitrarias de absorbancia (UAA).



Para la cepa SE 101 se observó la máxima formación de biofilm a 20°C en medio LB diluido 1/20, alcanzando valores de  $DO_{595}$  de 1,85, mientras que en medio LB a 28°C se obtuvieron valores de 1,5 de DO y a 37°C no hubo formación de biofilm. en ninguna de las concentraciones de medio de cultivo utilizadas (Figura 1.2.A).

Por otro lado, para la cepa ST 102 la formación de biofilm fue máxima en medio LB diluido 1/20 a 20°C, alcanzando valores de  $DO_{595}$  de  $1,25 \pm 0,9$  significativamente mayor respecto el crecimiento en medio LB sin diluir. Los valores de DO obtenidos a partir de biofilm de ST 102 incubadas a 28°C y 37°C no mostraron diferencias

significativas respecto al control del medio sin inocular. Soni *et al.* (2013) evaluaron la formación de biofilm de *Salmonella* Typhimurium a 22°C, 30°C y 37°C y encontraron valores de DO<sub>595</sub> mayores a la menor temperatura de incubación similar a lo obtenido para ST 102 (Figura 1.2.B).

Estudios previos han indicado que la formación de biofilm de *Salmonella spp.* ocurre en mayor medida entre 20°C y 22°C a las 48 hs de incubación (Giaouris *et al.*, 2005; Stepanovic *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la expresión de fimbrias en *S. Typhimurium* es dependiente de la temperatura, produciéndose a 28°C, pero no a 37°C (Gerstel y Romling, 2001). En la fase estacionaria del crecimiento, la disminución del nitrógeno y del fósforo inducen la expresión de *csgD* y por lo tanto la expresión de biofilm (Gerstel y Romling, 2001). Esto podría explicar que haya más biofilm a las 48 hs que a 24 hs y en condiciones de menor disponibilidad de nutrientes como ocurre en medio LB 1/20 para esta serovariedad. Sin embargo, también se producen cambios en la disponibilidad de oxígeno y en el pH, lo que podría tener un efecto adverso para la formación de biofilm de *S. Typhimurium*, dependiendo de la cantidad de nutrientes disponibles y del estado del promotor de *csgD*.

Respecto a la cepa SE 106, en medio diluido y a 20°C, el valor de DO fue de 0,45, el cual se incrementó significativamente con el aumento de temperatura hasta DO=1,75 a 37°C (Figura 1.2.C).

Para la cepa SE 115 en medio LB los valores de DO alcanzados fueron de 2,6±0,5, similares para las tres temperaturas. Estos valores fueron significativamente mayores respecto a los obtenidos en medio LB diluido a las tres temperaturas evaluadas (Figura 1.2.D).

De las cuatro cepas, SE 115 fue la que presentó una mayor formación de biofilm cuando se incubó durante 48 horas en medio LB a 28°C, alcanzando valores de DO<sub>595</sub> cercanos a 3 y esta capacidad no es afectada por la temperatura.

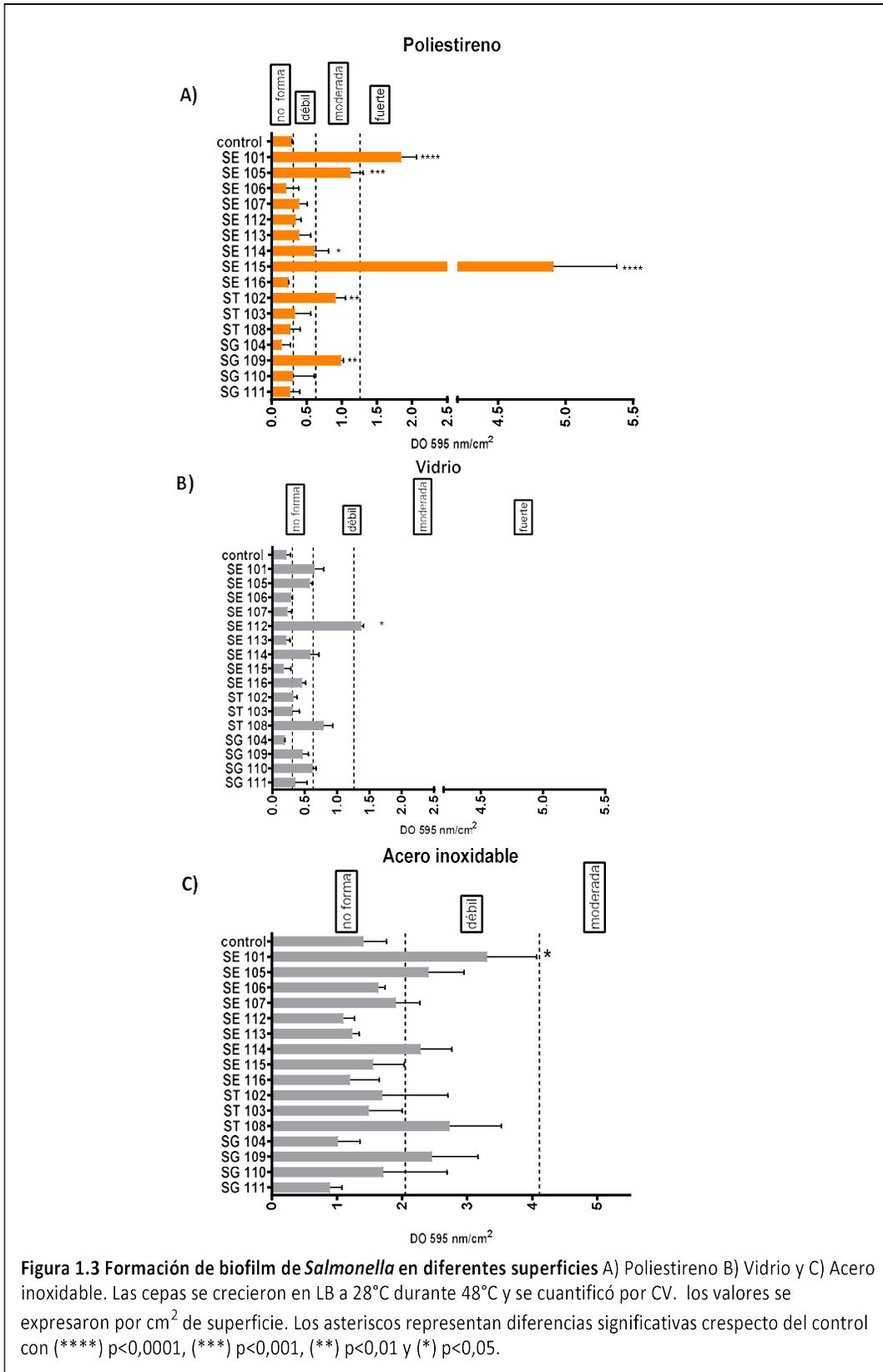
Según indican varios autores, la gran variabilidad demuestra que el desarrollo de los biofilms implica tanto propiedades de la superficie celular como interacciones célula-célula que determinan su estructura, función y composición (Karunakaran y Biggs, 2011; Wong y O'Toole, 2011). Estas interacciones se ven afectadas por el entorno químico y físico al que están expuestas las células bacterianas y la superficie, y tienen

lugar en el contexto de una compleja red reguladora (Karatan y Watnick, 2009; Palmer y Stoodley, 2007). Teniendo en cuenta que a 28°C se expresan los principales componentes de la matriz curli y celulosa, este podría ser el factor determinante de la formación de biofilm de SE 115.

### **2.1.2 Formación de biofilm de *Salmonella* distintas superficies**

En la industria de alimentos, *Salmonella* puede formar biofilms y persistir frente a la limpieza y desinfección de las superficies allí encontradas, pudiendo provocar contaminación y enfermedades (Gandhi y Chikindas, 2007; Pedersen *et al.*, 2008; Vestby *et al.*, 2009; Carpentier y Cerf, 2011; Chuah *et al.*, 2018). La formación de biofilms de *Salmonella* en superficies de contacto con alimentos es una de las mayores preocupaciones en seguridad alimentaria debido a la contaminación cruzada (Carrasco *et al.*, 2012). Las superficies de los materiales pueden tener diferente impacto sobre la adhesión y posterior formación de biofilm de *Salmonella* (De Oliveira *et al.*, 2014). De este modo, la relación entre las propiedades de superficie de las bacterias y la producción de biofilm debe ser analizada caso por caso (Wang *et al.*, 2013).

A fin de evaluar la interacción de las cepas de *Salmonella* sobre diferentes superficies, se estudió la formación de biofilm sobre vidrio y acero inoxidable y se comparó con los resultados obtenidos en el apartado anterior. Se seleccionaron como condiciones de ensayo: medio de crecimiento LB, a 28°C durante 48 hs y el biofilm se cuantificó por tinción con cristal violeta.



Como se observa en los gráficos, la capacidad de formación de biofilm de las cepas varía según la superficie estudiada. Se destaca que SE 115 fue la cepa de *Salmonella* que presentó significativamente la mayor capacidad de formación de biofilm en poliestireno frente al resto de las cepas estudiadas, pero no formó biofilm en ni vidrio ni en acero inoxidable. Por otro lado, la cepa SE 101 es fuerte formadora de biofilm en poliestireno, mientras que lo hace débilmente en vidrio y acero inoxidable. Del mismo modo, la cepa SE 112 presentó moderada capacidad de formación de biofilm en vidrio y débil en poliestireno, mientras que no formó biofilm en acero inoxidable.

Todas las cepas mostraron una formación de biofilm débil o nula en acero inoxidable, mientras que en vidrio sólo la cepa SE 112 presentó moderada formación de biofilm. El vidrio y el acero inoxidable son considerados materiales hidrofílicos mientras que el plástico es hidrofóbico (Donlan, 2002). Dantas *et al.* (2018) han demostrado que la formación de biofilm de *Salmonella* es mayor en superficies hidrofóbicas como plástico y madera que en superficies hidrofílicas como el vidrio. Este resultado confirma lo observado en nuestros ensayos.

Los materiales de plástico son ampliamente utilizados en la industria alimentaria para la construcción de tanques, cañerías, accesorios y superficies que entran en contacto directo como tablas de corte (Pompermayer y Gaylarde, 2000). Diversos estudios han determinado que *Salmonella* es capaz de formar biofilm en estas clases de materiales (Mireles *et al.*, 2001; Stepanović *et al.*, 2003; Paz-Méndez *et al.*, 2017; Cepeda y Franco, 2017).

Las cepas SG 104 y 111 y SE 106 resultaron no formadoras de biofilm en las tres superficies estudiadas. Este análisis, permitió evidenciar que no existe relación entre la serovariedad y el comportamiento frente a distintas superficies. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios previos que sugieren que la adhesión de *Salmonella* es cepa dependiente y no se encuentran relación entre las serovariedades analizadas, aún evaluando superficies con características marcadamente diferentes entre sí (Chia *et al.*, 2009; Abeysundara *et al.*, 2018).

En este estudio las cepas de *Salmonella* hidrofóbica (SE 112, 113, 114, 115) pudieron adherirse y formar biofilm con débil, moderada y fuerte capacidad sobre una superficie hidrofóbica como poliestireno, mientras que la cepa SE 116 con una hidrofobicidad

superficial similar no pudo formar biofilm en esta superficie. Sumado a esto, las cepas hidrofílicas SE 101 y 105 y SG 109, son capaces de formar biofilm sobre poliestireno. Estos resultados confirman que la hidrofobicidad no es el único factor involucrado en el crecimiento en biofilm. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Abdallah *et al.* (2014) quienes reportaron que cepas de *Salmonella* con superficie hidrofílica forman biofilm sobre una superficie hidrofóbica como poliestireno y que no existe correlación entre la hidrofobicidad de la superficie celular y la formación de biofilm.

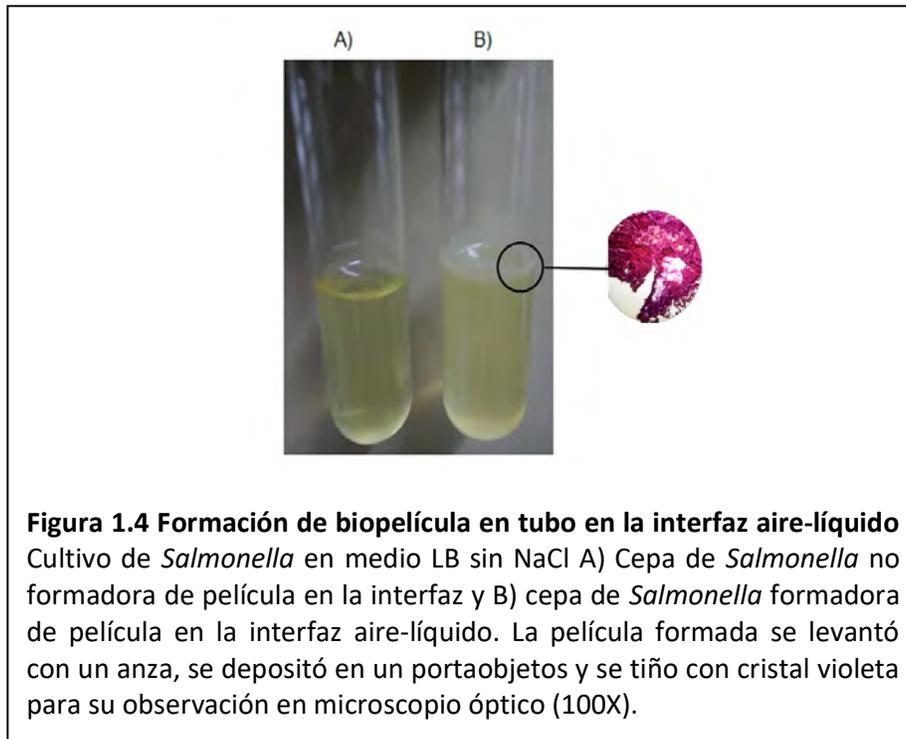
## **2.2 Formación de película en la interfaz aire-líquido**

Estudios recientes indican que *Salmonella* puede intercambiar entre formar biofilm adherida a la superficie del fondo del cultivo o formar una película en la parte superior del mismo, en la interfaz aire-líquido, dependiendo de las condiciones medioambientales, en un proceso que requiere la producción de fimbrias curli (Paytubi *et al.*, 2017; Vaccari *et al.*, 2017), celulosa (Ahmad *et al.*, 2016) y de la secreción de la proteína BapA (Latasá *et al.*, 2005).

La hidrofobicidad celular, la motilidad flagelar y / o la síntesis de polisacáridos extracelulares son factores que ayudan a las bacterias a permanecer dentro de la interfaz como una plataforma de película flotante o en contacto con el menisco (Donlan *et al.*, 2004; Estrada-Acosta *et al.*, 2014). Su desarrollo se ve afectado, entre otros factores, por el pH, la salinidad y la temperatura. De hecho, se utiliza medio LB sin NaCl dado que se ha observado previamente que la expresión de genes requeridos en la producción de polisacáridos vinculados a la formación de biopelícula se ve afectada en presencia de cloruro de sodio (O'tool y Kolter 1998). Además, se ha demostrado que la alta osmolaridad inhibe tanto la biosíntesis de flagelos como la actividad de *csgD*, los cuales son necesarios durante las etapas de iniciación de la formación de biofilm en *Salmonella* (Prigent-Combaret *et al.*, 2001; Goller y Romeo, 2008). El estudio de la formación de biofilm en la interfaz aire-líquido resulta interesante ya que las bacterias aeróbicas o aeróbicas facultativas tienen acceso al oxígeno y a los nutrientes (Medrano-Felix *et al.*, 2018).

En el marco de la tesis, el desarrollo de biofilm se registró como una película que flota en la interfaz entre el medio de cultivo y el aire, la cual bloquea totalmente la

superficie de cultivo y no puede ser dispersada mediante agitación (Latasa *et al.*, 2012). En la Figura 1.4 se muestran dos cepas de *Salmonella* formadoras de biofilm con diferente fenotipo en la interfaz luego de 96 horas de incubación.



T (hs)	SE 101	ST 102	ST 103	SG 104	SE 105	SE 106	SE 107	ST 108	SG 109	SG 110	SG 111	SE 112	SE 113	SE 114	SE 115	SE 116
24	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
48	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
96	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+



**Tabla 1.4 Formación de biopelícula en la interfaz aire-líquido de *Salmonella*.** El signo + indica la formación de película en la interfaz luego de 72 hs de incubación mientras que - indica que no se formó la película en estas condiciones.

Luego de 24 y 48 horas de incubación a 28°C se observó que las cepas SE 101, 105, 107, 112, 113, 115 y 116, SG 109 y ST 103 formaron una película en la interfaz aire-líquido. Para estas cepas, el tiempo de incubación no fue un factor determinante de la formación de biopelícula. Las cepas ST 102 y 108 formaron una película en la interfaz a partir de las 96 horas. Coincidiendo con estos resultados, Vestby *et al.* (2009) han

encontrado que la capacidad de formación de estas películas y su velocidad de formación varía entre las serovariedades de *Salmonella*, siendo *S. Typhimurium* una lenta formadora de estas películas ya que tarda 96 horas o más en hacerlo y este fenotipo se correlacionó con una menor capacidad de estas cepas de persistir en el ambiente.

Estudios previos demostraron que la formación de la película en la interfaz aire-líquido aumenta con la hidrofobicidad (Schäfer *et al.*, 1998). Sin embargo, la cepa SE 114 que resultó hidrofóbica, no formó película en la interfaz. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Medrano-Félix *et al.* (2018) donde no se encontró relación entre estas. Los autores sugieren que pueden intervenir varios factores, como la fase de crecimiento de la población y la producción de exopolisacáridos como se mencionó anteriormente, la temperatura, disponibilidad de nutriente, entre otros. Si se compara con la formación de biofilm sobre poliestireno, la cepa SE 114 no forma película en la interfaz, pero puede formar biofilm adherido a poliestireno. En este caso, la superficie abiótica puede ser determinante para el desarrollo del biofilm.

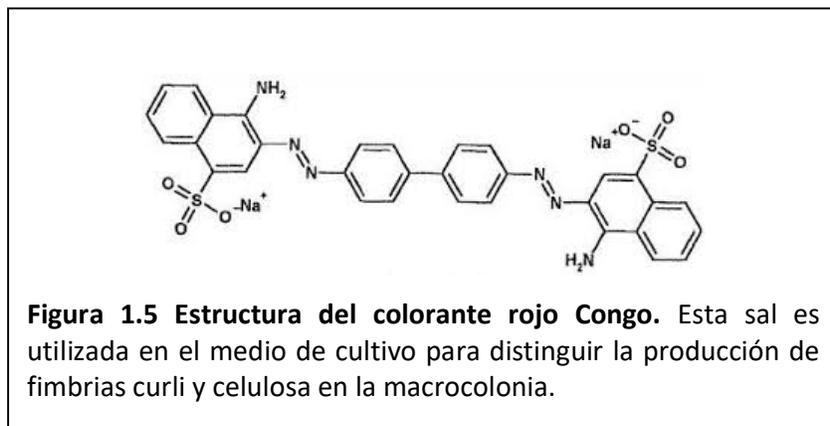
Por otro lado, las películas formadas por las cepas ST 102, 103, 108 y SE 107 fueron visiblemente más delgadas y se disgregaron más fácilmente por agitación con vortex. En este sentido, la síntesis de celulosa puede ser un factor importante. Ahmad *et al.* (2016) encontraron que cepas de *S. Typhimurium* mutantes deficientes en celulasa producen una película visiblemente más gruesa y fuerte atribuyéndolo a mayores cantidades de celulosa. Sin embargo, en este estudio no se observó una relación entre la autoagregación y la capacidad de formar película en la interfaz aire líquido. La cepa SE 106 que alcanzó el mayor porcentaje de autoagregación (54%) no formó película mientras que ST 102 y 108, con porcentajes de autoagregación de 45% y 42% respectivamente, formaron película en la interfaz a las 96 horas. En este sentido, debe estudiarse la producción de estructuras como fimbrias curli y celulosa para determinar si existe una relación con la capacidad de formación de biofilm y de película en la interfaz. A raíz de esto, se planteó el siguiente estudio.

### **2.3 Morfotipo de colonias crecidas LB con rojo Congo**

Para estudiar la producción de curli y celulosa de las cepas de *Salmonella* se utilizó el método descrito por Römling *et al.* (2003) en el cual las bacterias se siembran sobre

placas de agar LB sin NaCl suplementado con rojo Congo y Coomassie blue G250. La celulosa es un polisacárido que consiste en polímeros de carbohidratos de unidades de D-glucosa unidas en  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4).

El rojo congo es una sal de sodio de 3,3'-([1,1'-bifenil]-4,4'-diyl)bis(4-aminonaftalen-1-ácido sulfónico), cuya fórmula es  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$  y su peso molecular es 696.66 g/mol (Martínez Tristán, 2012) (Figura 1.5). Dicho colorante es soluble en agua, conformando una suspensión coloidal de color rojo. Su solubilidad es mucho mejor en solventes orgánicos como el etanol. Por su gran afinidad por las fibras de celulosa y fimbrias agregativas, se adiciona al medio de cultivo para luego detectar dichas estructuras en las macrocolonias, las cuales se asocian a la producción de biofilm (Römling *et al.*, 1999).



Cuando se cultiva *Salmonella* en agar LB suplementado con rojo congo, la formación de una macrocolonia de fenotipo de color rojo, seco y rugoso (RDAR), con bordes lisos o irregulares, indica la presencia de fimbrias curli y celulosa, principales componentes de la matriz del biofilm de *Salmonella*. En cambio, una colonia de fenotipo blanca y de aspecto suave o liso (SAW) indica la ausencia de estas estructuras. Aquellas colonias que presentan un fenotipo de color rosado (PDAR) expresan celulosa pero no fimbrias curli, mientras que, al contrario, el fenotipo de color marrón, seco y rugoso (BDAR) indica producción de curli, pero no celulosa (Römling *et al.*, 2003). A modo de resumen, en la Figura 1.6 se muestra las imágenes de las cepas SE 115, SE 106 y SE 114, el fenotipo asociado y la nomenclatura correspondiente.



Fenotipo	RDAR	PDAR	SAW
Curli	+	-	-
Celulosa	+	+	-

**Figura 1.6 Morfología de las colonias de *Salmonella* en agar LB con Rojo Congo.** Las fotografías corresponden a la colonia desarrollada luego de la incubación a 28°C durante 48 hs y en el cuadro se muestran los componentes que están presentes de acuerdo al morfotipo indicado como (+) produce y (-) no produce.

Luego de 72 horas de incubación de las cepas de *Salmonella* en estufa a 28°C se encontraron los siguientes resultados expresados en la Tabla 1.5.

Cepa <i>Salmonella</i>	Fenotipo	Interpretación
SE 101	RDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>+</sup>
SE 105	RDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>+</sup>
SE 106	PDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>-</sup>
SE 107	RDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>+</sup>
SE 112	RDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>+</sup>
SE113	RDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>+</sup>
SE 114	SAW	Celulosa <sup>-</sup> ; Curli <sup>-</sup>
SE 115	RDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>+</sup>
SE 116	PDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>-</sup>
ST102	PDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>-</sup>
ST 103	RDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>+</sup>
ST 108	PDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>-</sup>
SG 104	PDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>-</sup>
SG 109	RDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>+</sup>
SG110	PDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>-</sup>
SG 111	PDAR	Celulosa <sup>+</sup> ; Curli <sup>-</sup>

**Tabla 1.5 Fenotipo de cepas de *Salmonella* incubadas en agar LB con rojo Congo.** El morfotipo de las macrocolonias se determinó por crecimiento de *Salmonella* en rojo congo a 28°C durante 72 horas. La interpretación de los resultados está indicada como: (+) produce y (-) no produce.

Como se observa en la Tabla 1.5, las cepas de *Salmonella* estudiadas presentaron los fenotipos RDAR, PDAR y SAW, mientras que no se encontraron cepas con el fenotipo

BDAR. Nueve de las 16 cepas presentaron colonias rojas, secas y rugosas (RDAR) mientras que 6 cepas mostraron un fenotipo PDAR y una sola cepa presentó fenotipo SAW. No se encontró relación entre los fenotipos encontrados y las serovariedades de *Salmonella* estudiadas.

Todas las cepas de *Salmonella* con fenotipo RDAR en rojo Congo (SE 101, 105, 107, 112, 113 y 115, ST 103 y SG 109) tuvieron la capacidad de formar de biofilm sobre poliestireno y también fueron capaces de formar una película flotante en la interfaz aire-líquido, como se mostró en la Figura 1.4. Por otro lado, SE 114 fue la única cepa que presentó un morfotipo SAW.

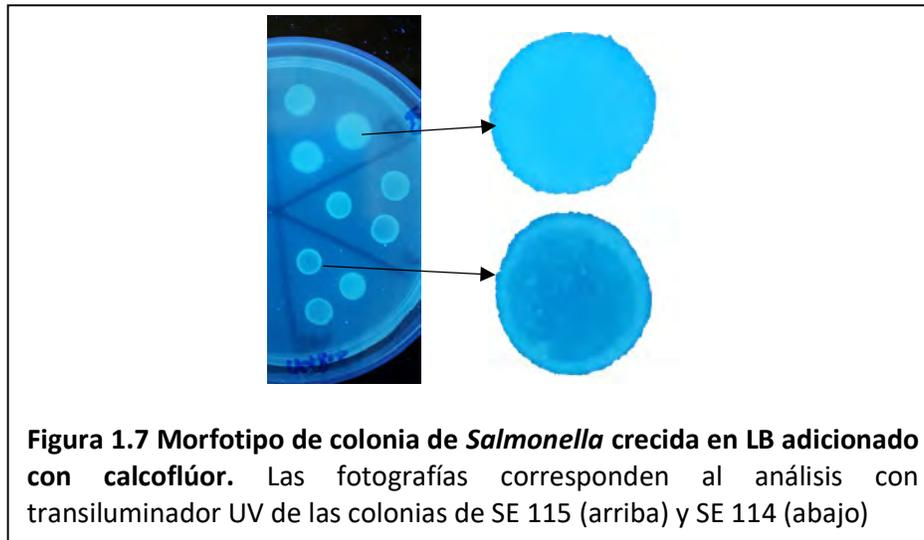
La conservación del fenotipo RDAR a lo largo de aislados patogénicos de *Salmonella* y las ventajas de supervivencia que esto confiere, sugiere que este fenotipo puede jugar un papel importante en la transmisión de *Salmonella* entre huéspedes. Ha sido demostrado que el fenotipo RDAR aumenta la resistencia de *Salmonella* a la desecación, ya que estas logran sobrevivir durante varios meses en ausencia de nutrientes en comparación con las mutantes deficientes en fimbrias curli y / o celulosa (White *et al.*, 2006). Así mismo la celulosa confiere mayor resistencia al tratamiento con hipoclorito de sodio. En este sentido, la determinación del morfotipo RDAR debe complementarse con el estudio de unión a calcoflúor que permite determinar fehacientemente la producción de celulosa.

#### **2.4 Determinación de la producción de celulosa por morfotipo en calcoflúor**

El calcoflúor es un fluoróforo que se une a las fibras de celulosa y por lo tanto puede utilizarse para determinar la presencia de este polisacárido en la matriz de los biofilms de *Salmonella*.

Las fimbrias curli y la celulosa se expresan ampliamente en Enterobacteriaceae, como *Salmonella ssp.*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Enterobacter spp.* y *Citrobacter spp.* (Bokranz *et al.*, 2005; Gerstel y Römling 2003; Solomon *et al.*, 2005). La coexpresión de estos componentes estructurales da como resultado una red altamente hidrófoba con células muy compactas alineadas en paralelo en una matriz rígida (Zogaj *et al.*, 2001; Giaouris *et al.*, 2015). Para determinar la producción de celulosa, las cepas de *Salmonella* se incubaron en placas de Petri conteniendo agar LB suplementado con calcoflúor. Las colonias obtenidas se observaron con un transiluminador con lámpara

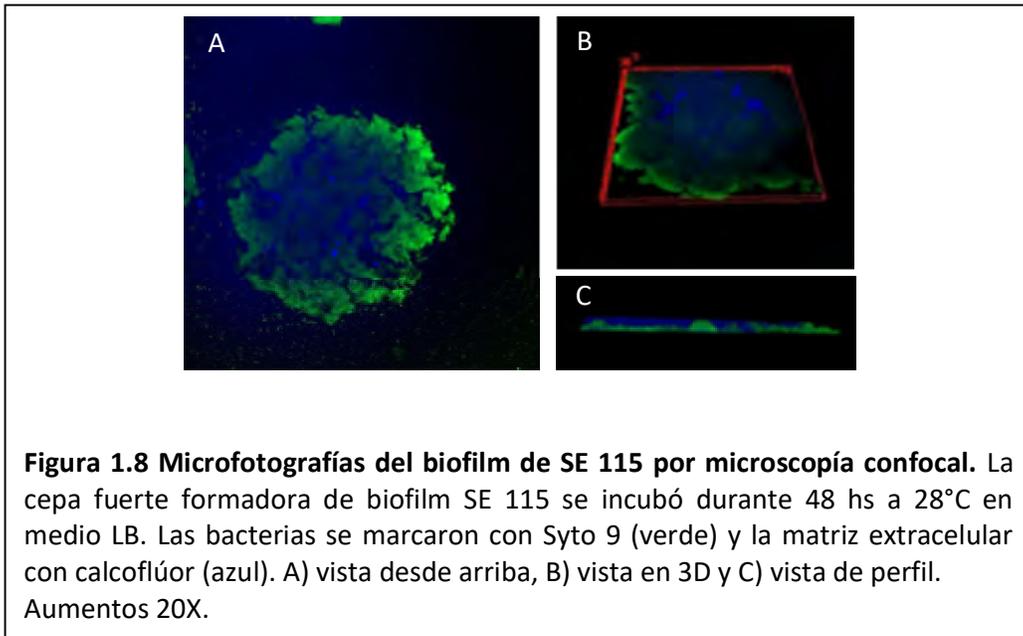
UV a 366 nm para detectar la fluorescencia debido a la presencia de celulosa unida al calcoflúor.



Todas de las cepas de *Salmonella* presentaron fluorescencia cuando se iluminaron con luz UV confirmando la presencia de celulosa. La Figura 1.7 muestra los morfotipos de colonia de SE 115 donde se puede ver fluorescencia en toda la colonia y SE 114 donde la fluorescencia se restringe a los bordes. El resto de las cepas presentaron iguales características que SE 115 con fluorescencia en toda la colonia. Se ha propuesto que la producción de celulosa puede depender del estado fisiológico de las bacterias (Serra *et al.*, 2013). En el borde de la colonia, donde se encuentran las células más jóvenes, se observa producción de celulosa por unión al calcofluor, mientras que las células más viejas del centro de la colonia, no la producen y el centro se observa con menor o nula intensidad de fluorescencia. Un morfotipo SAW en rojo Congo y fluorescente con calcofluor solo en algunos sectores de la colonia, también fue observado en otros estudios. Römling *et al.* (2003) encontraron que *S. Gallinarum* también presentó esta particularidad. En algunos casos, la biosíntesis de celulosa se desacopla (parcialmente) de la expresión del gen *csgD* que regula la expresión de curli y celulosa pudiendo encontrarse colonias SAW fluorescentes con calcofluor (Solano *et al.*, 2002).

### 3. Estudio de la formación de biofilm por microscopía confocal

En base a la mayor capacidad de formación de biofilm de SE 115 cuantificado previamente, se visualizó la estructura del biofilm mediante microscopía confocal. Para ello las bacterias en el biofilm se tiñeron con Syto 9 mientras que la matriz extracelular se tiñó con calcoflúor. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 1.8.



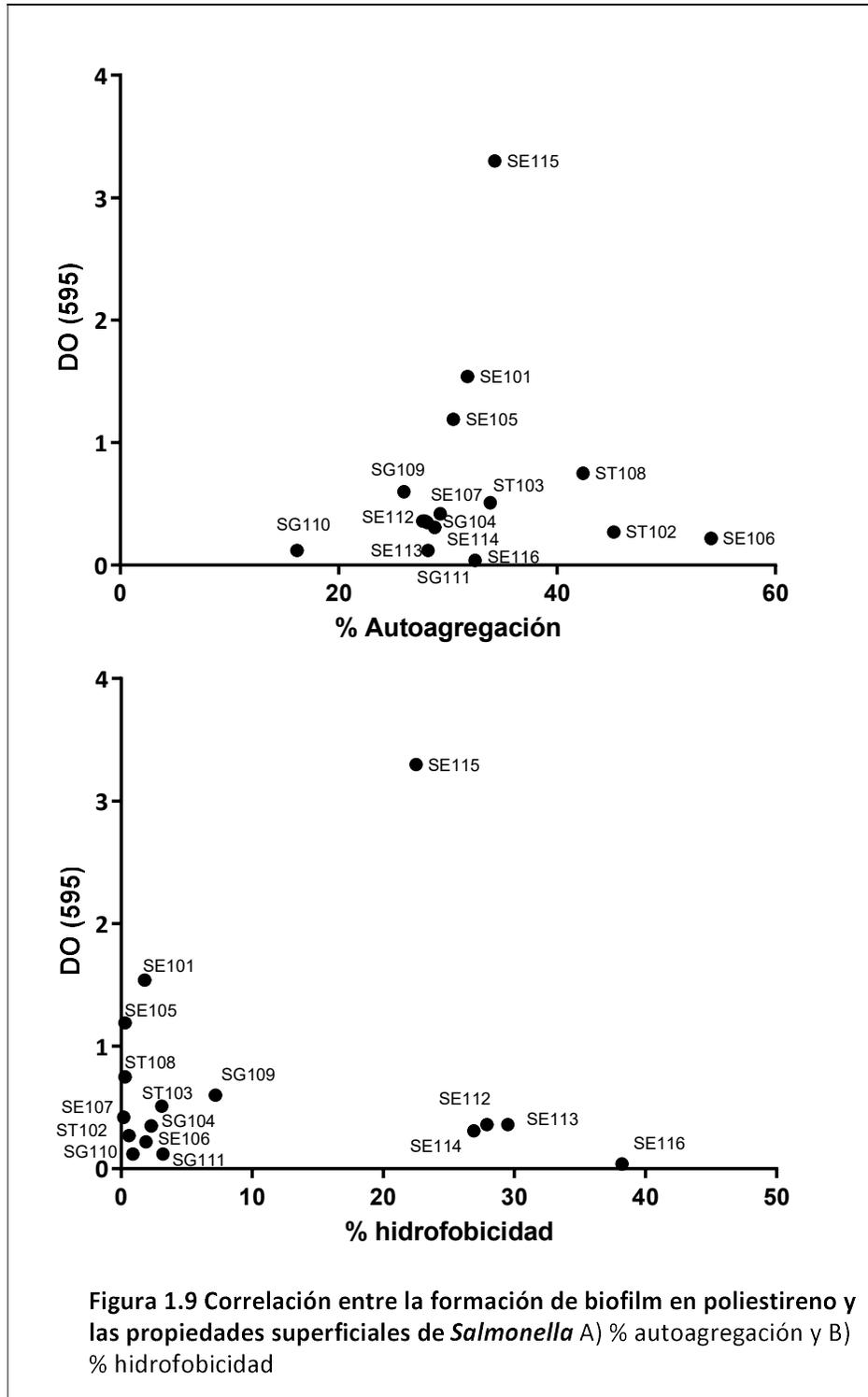
Las microfotografías muestran en verde las células en el biofilm de SE 115 las cuales se encuentran densamente unidas con una matriz polimérica extracelular en color azul. En algunas zonas, no se observan bacterias sino canales por donde podrían pasar sustancias y nutrientes hacia el interior del biofilm. El espesor medido de las bacterias y la matriz fue de 26  $\mu\text{m}$  lo que indica que en el tiempo de incubación se alcanzó a formar un biofilm maduro. Se ha descrito la formación de estos canales para el biofilm de *E. coli* donde las microfotografías de láser confocal muestran que las células de *E. coli* y la matriz extracelular forman una estructura 3D compleja con espacios de forma irregular que se asemejan a canales de agua que se observaron entre estructuras densas de bacterias (Maeyama *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2013). En estos trabajos, el espesor del biofilm fue aumentando con el tiempo hasta alcanzar decenas de micrómetros a las 24 horas de incubación.

#### 4. Análisis de correlaciones

#### **4.1 Propiedades superficiales y formación de biofilm**

La relación entre la hidrofobicidad superficial, la capacidad autoagregativa y la capacidad de formación de biofilms de las bacterias se encuentra documentada en la bibliografía (Vatsos *et al.*, 2001; Rickard *et al.*, 2004; Jacobs y Chenia, 2009; Lou *et al.*, 2016). La hidrofobicidad superficial se asocia con la adhesividad bacteriana y varía de organismo a organismo, entre cepa y cepa y está influenciada por el medio de crecimiento, el estado fisiológico y las estructuras de la superficie bacteriana (Herald y Zottola, 1988 ; Hood y Zottola, 1995 ; Chavant *et al.*, 2002 ; Gorski *et al.*, 2003 ; Moltz y Martin, 2005 ; James *et al.*, 2005; Folsom *et al.*, 2006).

Cinco cepas SE 101, 105, 113 y 115 y SG 109 a 28°C en medio LB presentaron moderada a fuerte formación de biofilm sobre poliestireno mientras que en vidrio y en acero inoxidable las cepas evaluadas no forman biofilm o lo hacen débilmente. En la Figura 1.9 se grafica la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* en función de la hidrofobicidad superficial o en función de la autoagregación.



El coeficiente de correlación lineal de Pearson entre la formación de biofilm y el porcentaje de hidrofobicidad fue de 0,065, y entre la formación de biofilm y el porcentaje de autoagregación fue de 0,07. Similares valores fueron encontrados por Li

*et al.* (2015). Estos resultados indican que no existe correlación entre estas variables en las condiciones estudiadas. La relación entre las propiedades superficiales de las bacterias y la cantidad de biofilm formado deben evaluarse para cada cepa.

#### 4.2 Relación entre formación de biofilm y características fenotípicas

Para relacionar las diferentes propiedades vinculadas a la formación de biofilm que se estudiaron en este capítulo, se presentan los resultados obtenidos en los ensayos previos se resumen en la Tabla 1.6.

Cepa <i>Salmonella</i>	Morfotipo en Rojo Congo	LB con Calcoflúor	Película interfaz aire-líquido	Cristal Violeta (poliestireno)
SE 101	RDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	+	FUERTE
SE 105	RDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	+	MODERADO
SE 106	PDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	-	DÉBIL
SE 107	RDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	+	DÉBIL
SE 112	RDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	+	DÉBIL
SE 113	RDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	+	MODERADO
SE 114	SAW Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>-</sup>	celulosa +	-	NO FORMA
SE 115	RDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	+	FUERTE
SE 116	RDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	+	NO FORMA
SG 104	PDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	-	NO FORMA
SG 109	RDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	+	MODERADO
SG 110	PDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	-	DÉBIL
SG 111	PDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	-	NO FORMA
ST 102	PDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	-	NO FORMA
ST 103	RDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	+	DÉBIL
ST 108	PDAR Curli <sup>+</sup> ; celulosa <sup>+</sup>	celulosa +	-	DÉBIL

**Tabla 1.6 Formación de biofilm y fenotipos de *Salmonella* estudiadas** Las cepas se crecieron en medio LB a 28°C durante 48 horas. Los signos indican (+) produce y (-) no produce.

Todas las cepas que mostraron moderada o fuerte capacidad de formación de biofilm en poliestireno por tinción con CV tienen un morfotipo RDAR y formación de película en la interfaz aire-líquido. Por otro lado, todas las cepas con morfotipo PDAR, es decir que producen celulosa pero no curli, no formaron película en la interface aire-líquido,

indicando que la síntesis de curli puede ser esencial para la producción de estas películas de *Salmonella*, coincidiendo con los resultados obtenidos por Paytubi *et al.* (2017). Además, estas cepas no pudieron formar biofilm en placa de poliestireno o lo hicieron débilmente.

El fenotipo rugoso (RDAR), en comparación con el fenotipo SAW, ha sido correlacionado con la habilidad de formar biofilm en poliestireno y una película en la superficie de tubos de vidrio en condiciones de baja salinidad y temperatura de 25°C a 30°C (Anriany *et al.*, 2001; de Rezende *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005). Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo, donde todas las cepas que mostraron formación de biofilm en placa de poliestireno, presentaron un morfotipo RDAR y formaron una película en la interfaz aire-líquido.

La cepa SE 115 con capacidad para producir película en la interfaz aire-líquido y fenotipo RDAR en rojo Congo resultó fuerte formadora de biofilm en poliestireno (2,5 veces más fuerte que la cepa SE 101 con características similares). Por otro lado, esta cepa ha sido aislada a partir de guano de una granja avícola de la provincia de Santa Fe. Por este motivo, resulta interesante estudiar el control de este tipo de microorganismos en contextos de granjas avícolas.

## Conclusiones

- Las cepas de *Salmonella* estudiadas mostraron un porcentaje de autoagregación entre el 16% y 55% a las 20 horas. Cinco cepas resultaron moderadamente hidrofóbicas ( $20 < H\% < 50\%$ ) y ninguna cepa estudiada resultó altamente hidrofóbica. Para estas cepas se encontró una correlación positiva entre ambas propiedades superficiales, pero no hubo correlación para las cepas hidrofílicas.
- No se encontró una correlación entre las propiedades superficiales y la capacidad de formación de biofilm, la cual resultó dependiente de las cepas, de las condiciones de cultivo y de la superficie de contacto.
- La cepa SE 115 presentó la mayor capacidad de formar de biofilm en las condiciones de cultivo de 28°C en medio LB sobre poliestireno durante 48 horas.
- Nueve de las 16 cepas evaluadas formaron una película en la interface aire-líquido. Todas ellas presentaron un fenotipo RDAR, indicando producción de fimbrias curli y celulosa.



CAPÍTULO II

---

CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL Y  
FORMACIÓN DE BIOFILM DE  
LACTOBACILOS

# CAPÍTULO 2

## Caracterización superficial y formación de biofilm de lactobacilos

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son un grupo heterogéneo de bacterias gram-positivas que comprenden varios géneros entre los que se encuentran *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* que han evolucionado en estrecha asociación con los humanos. Las LAB tienen un papel clave en la industria alimentaria, ya que se han utilizado tradicionalmente para iniciar los procesos de fermentación, contribuyendo así a la calidad y conservación de los alimentos fermentados (Savadogo, 2006; Moreno-Arribas *et al.*, 2008; Hugenholtz, 2008; Lahtinen *et al.*, 2010). Si bien su uso para fermentar alimentos se remonta a tiempos muy antiguos, en las últimas décadas, las LAB se han estudiado por sus propiedades beneficiosas para la salud, por su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y para posibles aplicaciones tecnológicas en la industria alimenticia y biomédica (Lewus *et al.*, 1991; Aguirre y Collins, 1993; Ringø *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019; Antara *et al.*, 2019). Algunas LAB tienen la capacidad de colonizar superficies abióticas formando biofilms lo cual podría contribuir a limitar el acceso a patógenos (Kubota *et al.*, 2009; Falagas y Makris, 2009; Hibbing *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2016). Estos lactobacilos y sus metabolitos presentes en el sobrenadante de los cultivos han mostrado previamente capacidad para inhibir patógenos tales como *Escherichia coli* enterohemorrágica (Hugo *et al.*, 2007), *Salmonella* Enteritidis (Golowczyc *et al.*, 2007), *Shigella flexneri* y *S. sonnei* (Kakisu *et al.*, 2013) y *Clostridium difficile* (Trejo *et al.*, 2010). Algunas de ellas como las cepas de *Lb kefir* poseen en su superficie proteínas de capa S que son arreglos planos de origen proteico o glico-proteico las cuales pueden alinearse en células individuales con diferentes simetrías cubriendo la superficie celular (Sára y Sleytr, 2000). Se ha propuesto que protegen a las bacterias del medioambiente hostil, mantienen la forma celular y están involucradas en diferentes

interacciones de la superficie celular (Konstantinov *et al.*, 2008; Golowczyc *et al.*, 2009). La presencia de capa S tiene una acción protectora sobre las células Caco-2 ya que inhibe la invasión de *Salmonella entérica* serovar enteritidis (Golwczyc *et al.*, 2007). Otras cepas son productoras de exopolisacáridos (EPS) (Gangoiti *et al.*, 2017), que son estructuras presentes en la matriz de biofilms (Flemming, 2007).

En este capítulo, se estudió la capacidad de autoagregación, la hidrofobicidad y la formación de biofilm en distintas condiciones de cultivo de siete cepas de lactobacilos aislados de distintas fuentes de alimentos previamente estudiadas en nuestro laboratorio. Se seleccionaron siete cepas de lactobacilos aisladas de diferentes fuentes alimentarias tales como leche y gránulos de kefir que han sido previamente aisladas y estudiadas en nuestro laboratorio.

# Objetivos

- Caracterizar 7 cepas de lactobacilos en cuanto a su capacidad de autoagregación y la hidrofobicidad.
- Evaluar la capacidad de formación biofilm de lactobacilos en distintas condiciones de cultivo y sobre distintas superficies presentes en la industria alimentaria
- Establecer si existe una relación entre las propiedades superficiales y la formación de biofilm.
- Estudiar la capacidad de interacción superficial entre lactobacilos y *Salmonella*



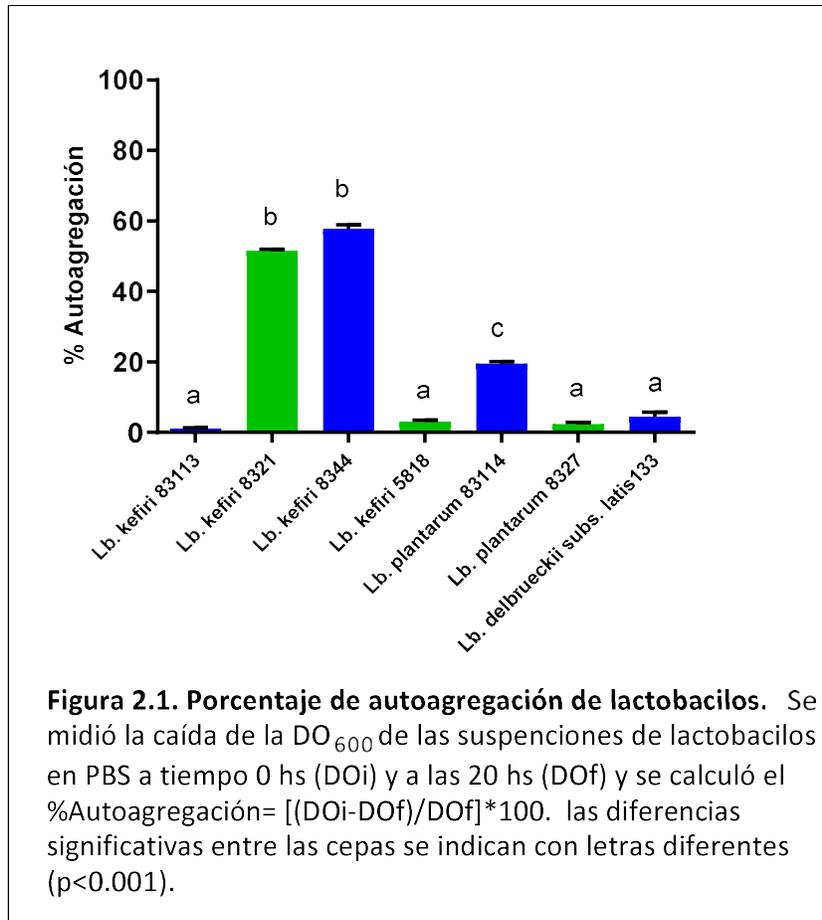
# Resultados y discusión

## 1. Caracterización de propiedades superficial de lactobacilos

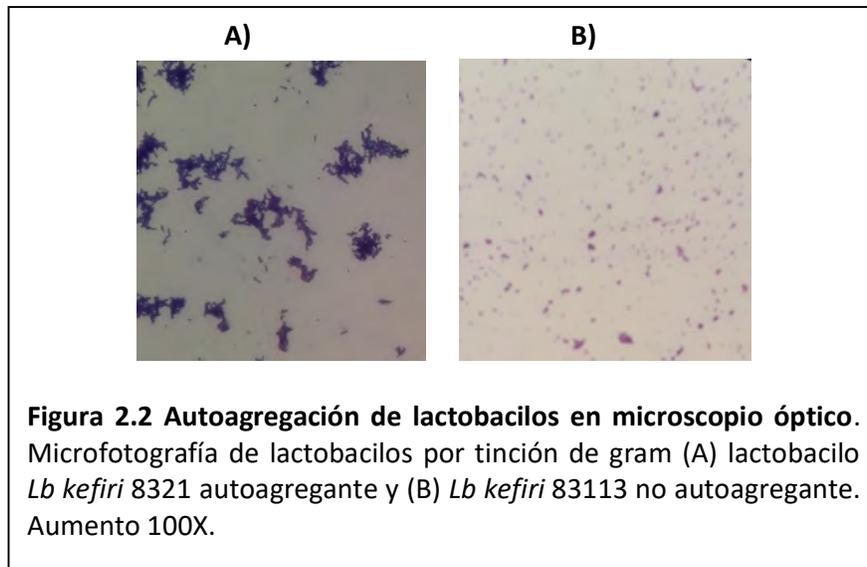
Entre las propiedades superficiales de LAB tales como la adhesión de bacterias a varias superficies y su autoagregación pueden estar reguladas por la síntesis de sustancias extrapoliméricas (EPS) (Rinaudi *et al.*, 2010) y ha sido relacionada también con su hidrofobicidad superficial (Collado *et al.*, 2007, 2008; Bao *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). Estudios previos demostraron que las proteínas, las glicoproteínas, proteínas de capa S y los ácidos teicoico y lipoteicoico en la superficie celular de las bacterias juegan un papel importante en la autoagregación y la hidrofobicidad de las cepas (Kos *et al.*, 2003; Golowczyc *et al.*, 2007; Lahtinen *et al.*, 2009; Goh y Klaenhammer, 2010). Ciertos lactobacilos pueden prevenir la adherencia de bacterias patógenas a la mucosa intestinal ya sea mediante la autoagregación que forma una barrera física o por coagregación con los patógenos (Collado *et al.*, 2007; Vlkov *et al.*, 2008). Los mecanismos propuestos para su actividad antimicrobiana relacionados a propiedades superficiales incluyen la competencia por los sitios de adhesión lo que lleva a la exclusión competitiva de los patógenos (Servin y Coconnier 2003; Woo y Ahn, 2013). Por lo tanto, debido a estos resultados, se evaluaron la autoagregación y el porcentaje de hidrofobicidad superficial de los lactobacilos.

### 1.1 Autoagregación

Para la determinación del porcentaje de autoagregación de los lactobacilos provenientes de cultivos 24 horas, se midió la disminución (caída) de la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de una suspensión de lactobacilos en PBS manteniendo el tubo en forma estática de manera que las bacterias sedimenten durante 24 horas. En la Figura 2.1, se muestran los resultados del porcentaje de autoagregación para las cepas de lactobacilos empleadas.



Como se observa en la Figura 2.1 se establecieron tres grupos de bacterias en función de su capacidad de autoagregar: altamente autoagregantes ( $\%A > 50\%$ ), *Lb kefir 8321* y *Lb kefir 8344* con porcentajes de autoagregación de 51,5 y 58%, respectivamente; *Lb plantarum 83114* que resultó moderadamente autoagregante ( $50\% > \%A > 20\%$ ), y *Lb kefir 83113* y 5818, *Lb plantarum 8327* y *Lb delbrueckii sub. latis 133* que no superaron el 5% de autoagregación ( $\%A < 20\%$ ). Cultivos de 24 horas *Lb kefir* cepas 83113 y 8321 fueron tratados mediante tinción de Gram y analizados por microscopia de óptica. Para la cepa 8321 se observaron acúmulos bacterianos con muy pocas células libres (Figura 2.2 A), confirmando la naturaleza autoagregante de esta cepa. Para *Lb kefir 83113* no se observaron acúmulos bacterianos (Figura 2.2 B), como es de esperarse para las cepas no autoagregantes.



Es importante destacar que las cepas de *Lb. kefir* poseen proteínas de capa S en su superficie, lo cual podría favorecer la interacción entre bacterias como se ha dicho anteriormente. En concordancia con esto, varios trabajos han demostrado que la remoción de las proteínas de la superficie de lactobacilos con LiCl 5M reduce el porcentaje de autoagregación en *Lb crispatus* y *Lb acidophilus* (Kos *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007), *Lb. kefir* (Garrote *et al.*, 2004), *Lb fermentum* y *Lb lactis* (Li *et al.*, 2014) y *Lb helveticus* (Beganovic *et al.*, 2011). En nuestro estudio, las cepas *Lb kefir* 83113 y 5818 que presentan proteínas de capa S en su superficie, no mostraron capacidad autoagregante. Malamud *et al.* (2016) encontraron que la capa S de las cepas de lactobacilos agregantes, entre ellas *Lb kefir* 8321, comparten el 100% de su secuencia de aminoácidos, sugiriendo que algunas características estructurales comunes de estas proteínas serían responsables, al menos en parte, de la capacidad de autoagregación de las bacterias.

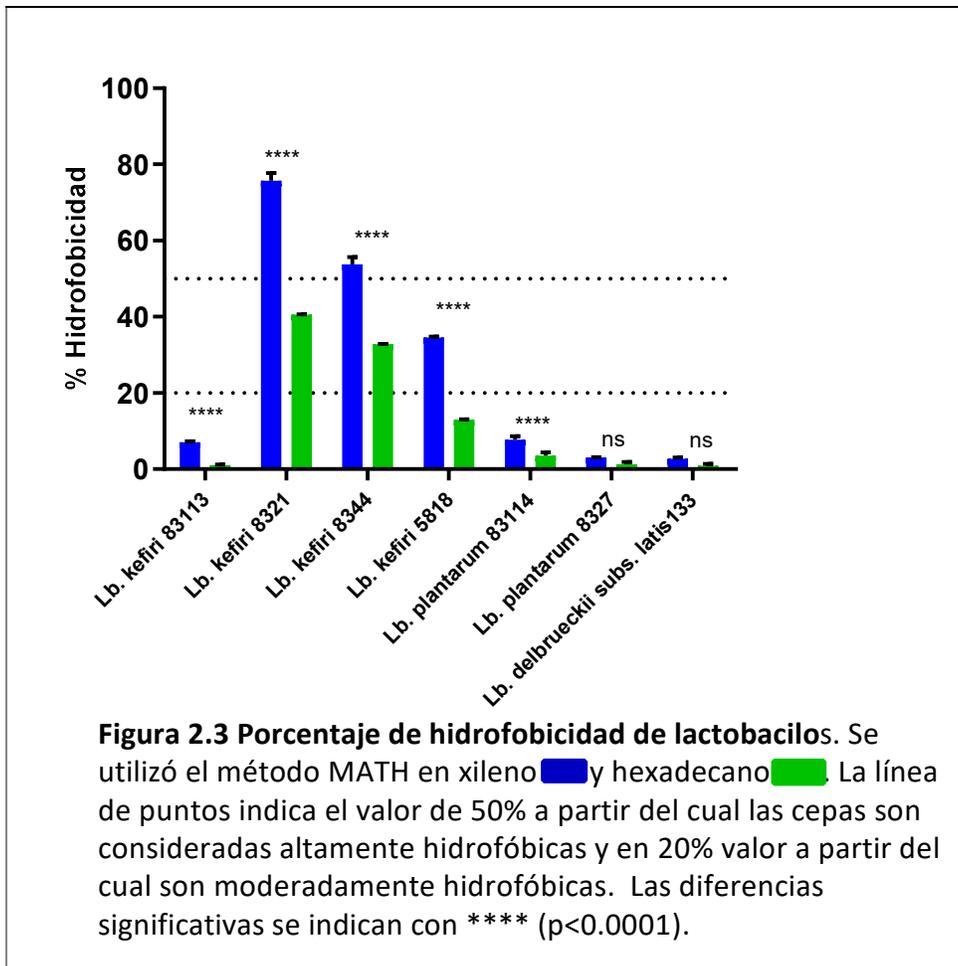
Nuestros resultados concuerdan con Li *et al.* (2015) que estudiaron 18 cepas de lactobacilos de diferentes especies portadoras o no de proteínas de capa S, y también encontraron que la capacidad autoagregativa es cepa-dependiente y debe estudiarse en cada caso. Esto muestra que la habilidad de los lactobacilos para autoagregar depende de otras estructuras de superficie tales como proteínas de adhesión, de la hidrofobicidad superficial (Kos *et al.*, 2003; Van Der Mei *et al.*, 2003; Vadillo-Rodriguez

*et al.*, 2005; Ekmekci *et al.*, 2009; Leccese Terraf *et al.*, 2014) y la presencia de polisacáridos extracelulares (Sillanpaa *et al.*, 2000; Kos *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2008).

Se observa además que las cepas de *Lb plantarum* que producen EPS presentaron bajo % de autoagregación, lo que podría indicar que no hay una relación entre la producción de EPS y la capacidad de interacción entre las bacterias.

### 1.2 Hidrofobicidad

En la Figura 2.3 se muestran los resultados de porcentaje de hidrofobicidad de las cepas de lactobacilos estudiadas utilizando xileno y hexadecano como solventes. Se puede ver que para varias cepas los porcentajes de hidrofobicidad son significativamente diferentes según el solvente utilizado, aunque en ambos casos se observaron las mismas tendencias.



Como se mencionó anteriormente, las cepas se clasificaron en altamente hidrofóbica ( $\geq 50\%$ ), moderada (de 20 a 50%) e hidrofílica ( $\leq 20\%$ ) según la clasificación hecha por Di Bonaventura *et al.* (2008).

La cepa *Lb. kefir* 8321 mostró mayor afinidad hacia los solventes utilizados, alcanzando valores de hidrofobicidad superficial de 75,7% en xileno y 40,5% en hexadecano, mientras que *Lb kefir* 8344 alcanzó valores de 54% en xileno y 33% en hexadecano. Se observó además que estas cepas habían presentado capacidad autoagregante, indicando una posible relación entre esta propiedad y la hidrofobicidad superficial. Estos resultados concuerdan con trabajos previos donde los lactobacilos con alta capacidad de autoagregación también presentan elevada hidrofobicidad (Chen *et al.*, 2010; Nikolic *et al.*, 2010). Tuo *et al.* (2013) han observado que existe una correlación positiva entre la autoagregación y la hidrofobicidad de 15 cepas de *Lb plantarum*.

Por otro lado, las cepas de *Lb plantarum* 83114 y 8327 y *Lb delbrueckii subsp. lactis* 133 mostraron ser hidrofílicas en ambos solventes ya que no superaron el 20% de hidrofobicidad superficial. Esto está en concordancia con estudios previos que indican que *Lb plantarum* posee una superficie hidrofílica (Golowczyc, 2008; Ramos *et al.*, 2013) mientras que *Lb delbrueckii subsp. lactis* presenta una gran variabilidad en la hidrofobicidad superficial (Guglielmotti *et al.*, 2007).

## 2. Formación de biofilm

Cepas del género *Lactobacillus* pueden formar biofilms tanto en superficies bióticas como abióticas (Lebeer *et al.*, 2007; Kubota *et al.*, 2008; Lebeer *et al.*, 2010; Fernandez-Ramirez *et al.*, 2015; Slížová *et al.*, 2015; Aoudia *et al.*, 2016). Se ha demostrado que lactobacilos en biofilm pueden producir sustancias antimicrobianas tales como reuterina (Jones y Versalovic, 2009) la cual posee capacidad para inhibir el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos incluyendo bacterias gram positivas y gram negativas, hongos y protozoos (Talarico y Dobrogosz, 1989).

También se ha encontrado que el biofilm de bacterias probióticas pueden desplazar biofilms de bacterias patógenas. Saunders *et al.* (2007) demostraron que el biofilm de como *Lb reuteri* desplaza el biofilm del patógeno *Gardnerella vaginalis* constituyendo un biofilm protector del tracto urogenital femenino. Gómez *et al.* (2016) demostraron

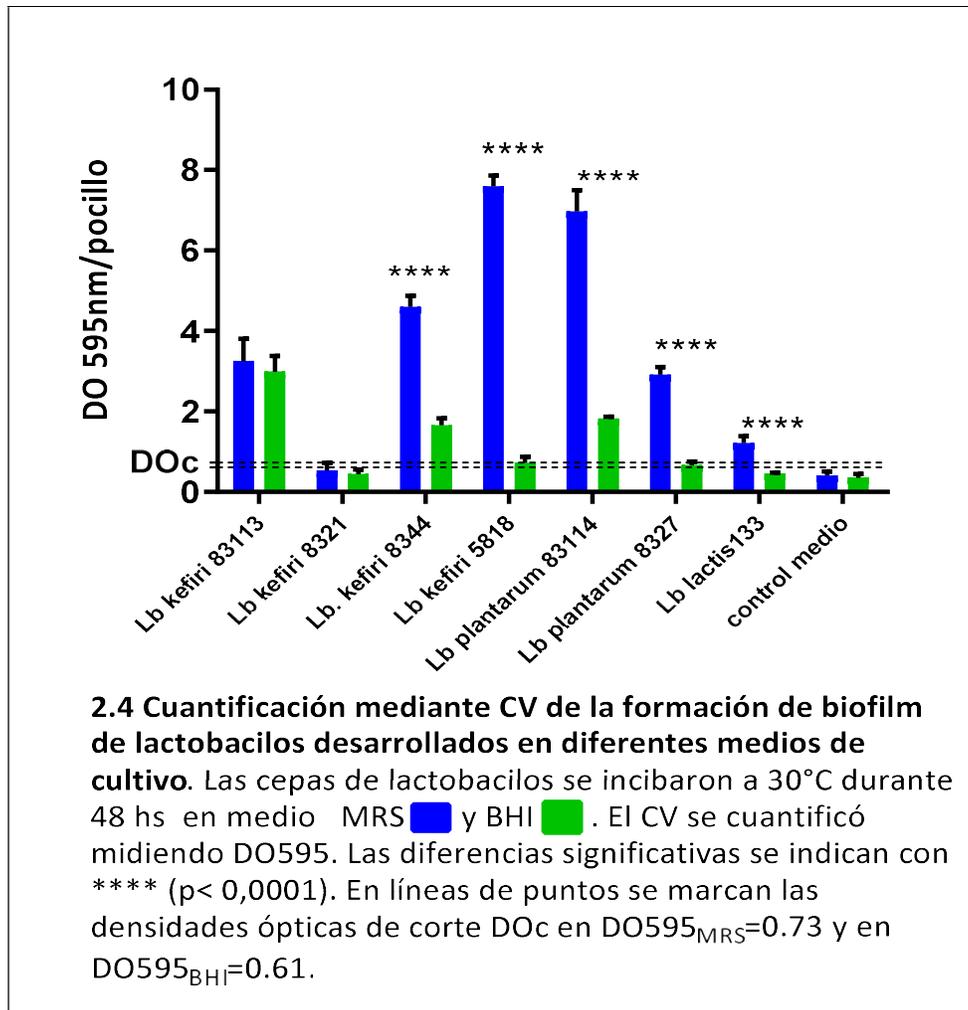
que los biofilms de *L lactis*, *Lb curvatus* y *Lb sakei* inhiben la formación de biofilm de *Listeria monocytogenes*, *E coli* O157:H7 y *S. Typhimurium* dada por la combinación de múltiples factores como la producción de bacteriocinas y biosurfactante. Kim *et al.* (2006) encontró que la producción de EPS de *Lb acidophilus* tiene actividad anti-biofilm de *E. coli* enterohemorrágica, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Yersinia enterocolítica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*.

En esta parte del trabajo, se estudió la capacidad formadora de biofilm de lactobacilos que presentaron diferentes propiedades superficiales. Varias condiciones de cultivo fueron estudiadas a fin de entender el impacto de estos factores en la adhesión y desarrollo de los microorganismos sobre superficies abióticas. Por un lado, se estudió el efecto de distintos medios de cultivo como MRS que es el medio habitualmente utilizado para cultivar lactobacilos y BHI, donde además pueden crecer otras bacterias tales como *Salmonella*. Por otro lado, se evaluó la formación de biofilm sobre distintas superficies, encontradas habitualmente en el ámbito de la producción de alimentos tales como poliestireno, vidrio y acero inoxidable.

## **2.1 Formación de biofilm de lactobacilos en distintos medios de cultivo**

### **2.1.1 Cuantificación por la técnica de cristal violeta**

Varios estudios han demostrado que la composición del medio de crecimiento de las bacterias lácticas puede afectar su capacidad para formar biofilms (Rochex *et al.*, 2007; Leeber *et al.*, 2007; Terraf *et al.*, 2012). Para evaluar el efecto del medio de cultivo, los lactobacilos se crecieron en medio MRS o BHI y el biofilm formado se cuantificó mediante tinción con cristal violeta. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.4.



Como se observa la Figura 2.4 el MRS es el medio de cultivo en el cual la formación de biofilm fue mayor cuando se cuantificó por CV. En medio BHI sólo la cepa *Lb kefirii* 83113 presentó una fuerte formación de biofilm, alcanzando valores similares a los obtenidos en MRS cercanos a  $DO_{595} = 3$ . Por otro lado, *Lb kefirii* 5818 fue la cepa que mayor capacidad de formación de biofilm presentó, alcanzando valores de  $DO_{595}$  cercanos a 8, seguida de *Lb plantarum* 83114 con  $DO_{595}=7$ , y las cepas *Lb kefirii* 8344 y 83113 y *Lb plantarum* 83114 con valores cercanos a  $DO_{595}=4$ .

Se realizó una clasificación de las cepas de lactobacilos por su capacidad de formar biofilm, según el criterio definido por Stepanović *et al.* (2004). El valor  $DO_{595}$  de corte (DOc) se definió como 3 desviaciones estándar por encima de promedio de DO del control negativo.

$DO \leq DO_{corte}$  = no formadora de biofilm (nFB)

$DO_{corte} < DO \leq 2 \times DO_{corte}$  = débil formadora de biofilm (dFB)

$2 \times DO_{corte} < DO \leq 4 \times DO_{corte}$  = moderada formadora de biofilm (mFB)

$4 \times DO_{corte} < DO$  = fuerte formadora de biofilm (fFB)

Según este criterio, las cepas estudiadas se clasificaron como se resume en la Tabla 2.1.

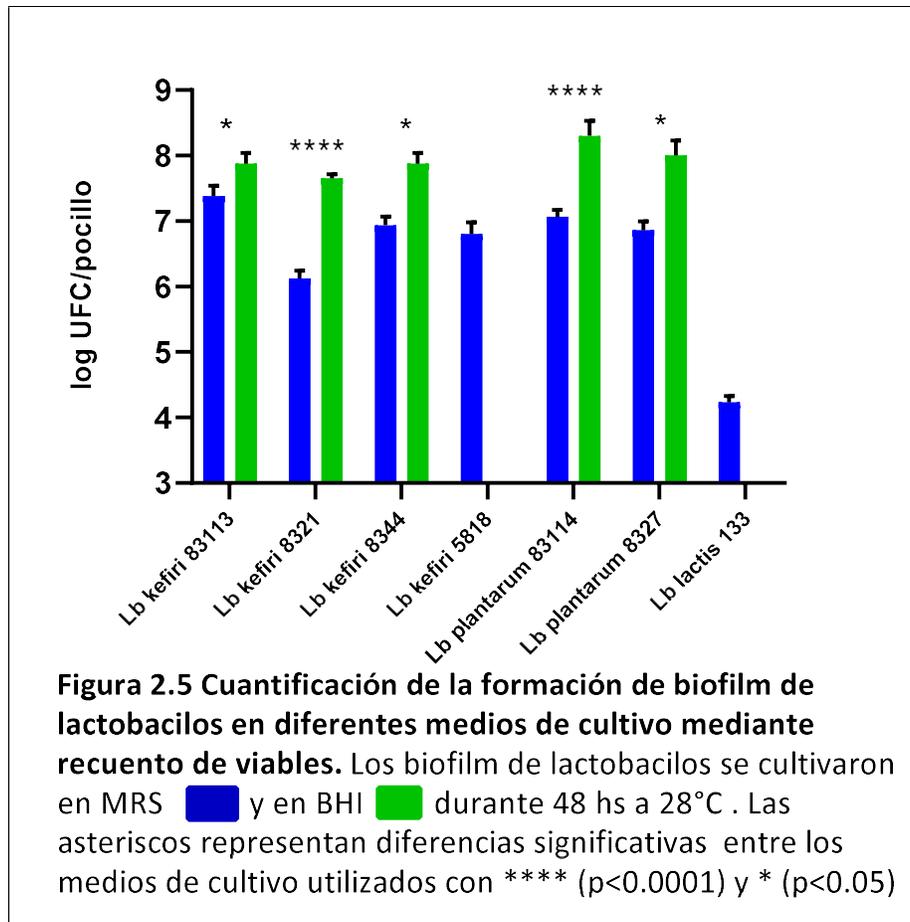
Medio de cultivo	Cepa lactobacilo						
	83113	8321	8344	5818	83114	8327	133
MRS	fFB	nF	fFB	fFB	fFB	mFB	dFB
BHI	fFB	nF	mFB	dFB	mFB	dFB	nFB

**Tabla 2.1. Capacidad formadora de biofilm de lactobacilos en medio MRS o BHI.** La capacidad de formación de biofilm se indicó como: cepas no formadoras de biofilm (nF) y formadoras de biofilm con débil (dFB), moderada (mFB) o fuerte (fFB) capacidad.

Excepto la cepa *Lb kefir* 8321, todos los lactobacilos fueron fuertes o moderados formadores de biofilm cuando se crecieron en MRS, mientras que en el medio BHI las cepas fueron débiles, moderadas o no formadoras de biofilm (Tabla 2.1). La cepa *Lb delbrueckii subsp. lactis* 133 resultó débil formadora de biofilm en MRS y no formadora en BHI.

### 2.1.2 Cuantificación por recuento de viables

El ensayo por tinción CV se utiliza para la cuantificación del biofilm total ya que además de células vivas, también puede teñir los componentes de la matriz como células muertas, ADN extracelular, proteínas y/o exopolisacáridos. Por lo tanto, es un buen método para cuantificar la biomasa total pero no proporciona información sobre número de células viables en el biofilm (Merritt *et al.*, 2005). Para determinar esto, la formación de biofilm de lactobacilos se cuantificó también mediante recuento de viables, como se muestra en la Figura 2.5.



En la Figura 2.5 se observa que el número de células viables en el biofilm fue mayor en BHI que en MRS excepto para las cepas *Lb kefir 5818* y *Lb delbrueckii sub. lactis 133* las cuales no fueron detectadas por esta técnica cuando se crecieron en BHI. La técnica de CV detecta la formación de biofilm a partir de 6,8 log UFC/pocillo por lo que puede no detectar niveles bajos de formación de biofilms (Castelijm *et al.*, 2012). La cepa *Lb kefir 8321*, para la cual la tinción con CV resultó no formadora de biofilm en ambos medios de cultivo, alcanzó recuentos de entre  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^7$  UFC/pocillo en MRS y en BHI respectivamente. Wang *et al.* (2013) afirmó que más de 5 log UFC/cm<sup>2</sup> es necesaria para decir que una cepa es formadora de biofilm. Por la tanto, la cepa *Lb kefir 8321* puede adherirse y formar biofilm, aunque la cantidad de matriz extracelular formada no permite detectarla por CV. Fernandez-Ramirez *et al.* (2015) estudiaron la formación de biofilm de *Lb plantarum* en distintas condiciones de cultivo, encontrando que todas las cepas presentaron mayor capacidad de formación de biofilm en medio BHI que en

MRS y demostraron que la tinción con CV y el recuento de células viables en el biofilm están poco correlacionadas. Si bien los investigadores obtenían recuentos de  $10^7$ - $10^8$  UFC/pocillo, la cuantificación mediante CV estaba cercano al límite de detección para algunas cepas, mientras que para otras cepas la tinción con CV resultaba en altos valores de  $DO_{595}$  indicando que la muerte celular o la lisis libera productos como eDNA y/o proteínas que contribuyen a la matriz extracelular. En este sentido, mayores cantidades de biofilm obtenidos en MRS, detectados por CV, se corresponderían con grandes cantidades de macromoléculas secretadas durante la lisis de un mayor número de bacterias respecto al biofilm en BHI.

Los resultados publicados por otros autores indican cierta controversia en cuanto a la capacidad de lactobacilos de formar biofilm en un medio de cultivo típico como el MRS. Leccese Terraf *et al.* (2012) estudiaron 15 cepas de lactobacilos las cuales no formaron biofilm en medios de cultivo estándar para bacterias lácticas (caldos MRS y LAPTg) en microplacas de poliestireno. Además, la limitación de las fuentes de carbono (por ejemplo, omisión de glucosa) o de cationes divalentes (por ejemplo, omisión de  $Mn^{+2}$ ), no estimularon el desarrollo de biofilm. Lebeer *et al.* (2007) mostró que *Lb rhamnosus* GG no pudo formar biofilm después de 24 a 96 h en medio MRS, pero formó biofilm en condiciones con restricción de nutrientes. Sin embargo, los autores anteriores no evidenciaron la formación de biofilm en MRS sin glucosa con diferentes *Lb rhamnosus* y *Lb casei*. Por otro lado, Martín *et al.* (2008) mostraron que cepas de *Lb jensenii* se adhirieron fuertemente a un sustrato de plástico en medio MRS, lo que indica que esta propiedad depende de las diferentes cepas y de factores ambientales.

Como se dijo anteriormente, las cepas de *Lb kefir* poseen proteínas de capa S en su superficie mientras que las cepas de la especie *Lb plantarum* producen polisacáridos extracelulares (Hamet *et al.*, 2015). Dado que las proteínas de capa S forman parte de la estructura superficial más externa de las bacterias, se ha propuesto que pueden participar de la adhesión bacteriana a diferentes superficies (Kotiranta *et al.*, 1998; Schneitz Sakakibara *et al.*, 2007). En nuestro estudio hemos encontrado que, excepto *Lb kefir* 8321, las cepas de *Lb kefir* con capa S, tienen fuerte capacidad para formar biofilm en MRS, evaluado tanto por tinción con CV como por recuento. Idéntico resultado se obtuvo para las cepas de *Lb plantarum* 83114 y 8327 las cuales, si bien no presentan proteínas de capa S, poseen otras proteínas de superficie. Se conoce que el

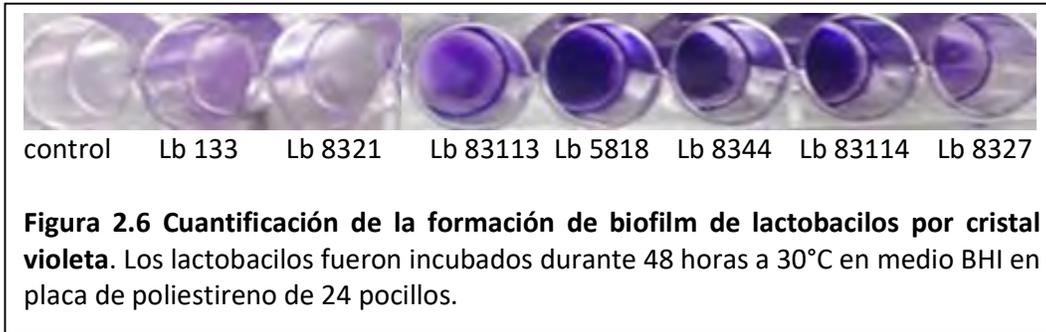
factor de elongación Tu (EF-Tu), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la triosafosfato isomerasa (TPI) son proteínas unidas a la superficie con un papel en la adhesión de *Lactobacillus plantarum* (Ramiah *et al.*, 2008). Estudios previos en nuestro grupo demostraron que *Lb plantarum* 8327 produce un  $\alpha$ -glucano compuesto por glucosa cuando crece en leche y un heteropolisacárido compuesto principalmente de glucosa, glucosamina y ramnosa cuando crece en un medio con glucosa (Gangoiti *et al.*, 2017). Dado que MRS y BHI contienen glucosa, esta cepa podría estar formando un exopolisacárido. Por otro lado, ha sido determinado que *Lb plantarum* 83114 también es capaz de producir polisacárido cuando se cultiva en leche (Hamet *et al.*, 2015). Como los polisacáridos han sido descritos como el principal componente de la matriz extracelular de los biofilms (Frølund *et al.*, 1996; Wingender *et al.*, 2001, Flemming y Wingender, 2010) y fueron relacionados tanto al establecimiento de microcolonias en la fase inicial de la formación de biofilms como a la estabilidad mecánica de biofilms maduros (Ma *et al.*, 2009), la presencia de estas sustancias podría estar implicadas en la formación de biofilm de estas cepas de *Lb. plantarum*.

La cepa *Lb delbrueckii sub lactis* 133 que no posee proteínas de capa S ni produce exopolisacáridos, mostró escasa o nula capacidad de formar biofilm por CV ni por recuento de viables. Nuestros resultados nos indican que la presencia de capa S y la producción de EPS estarían implicadas en la formación de biofilm.

## **2.2 Formación de biofilm en distintas superficies**

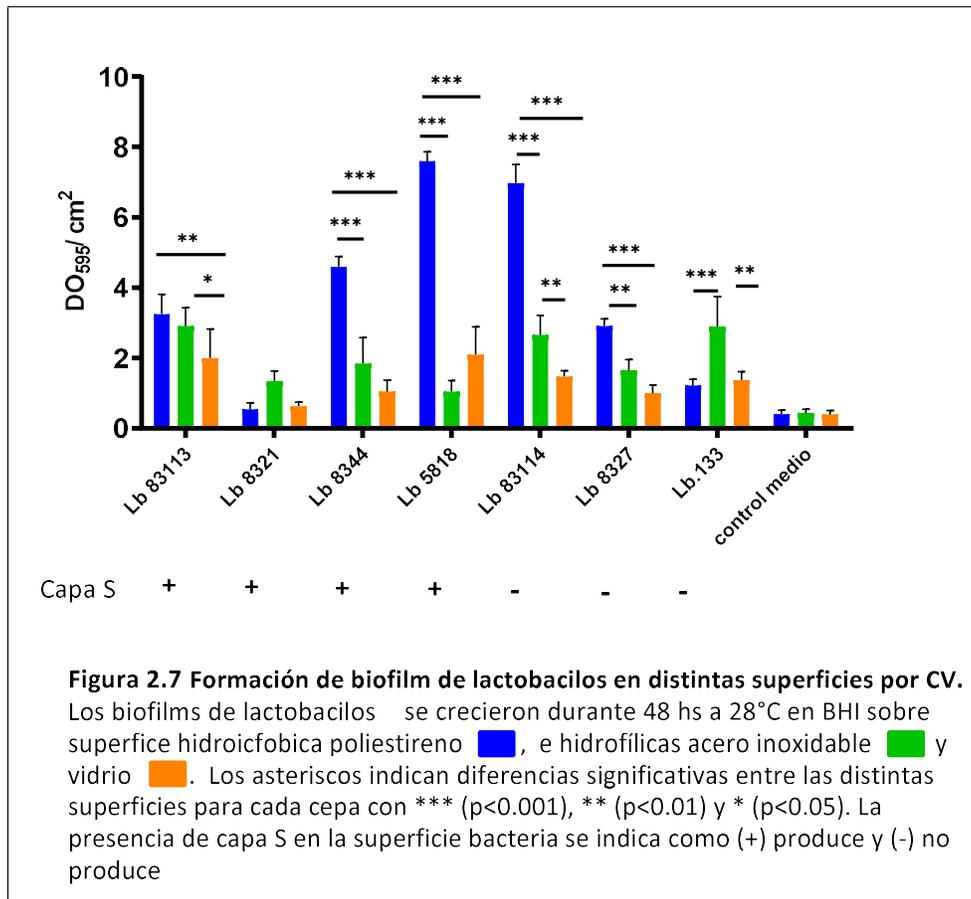
Por lo visto anteriormente, se propuso caracterizar la capacidad de lactobacilos de formar biofilm en vidrio, acero inoxidable y poliestireno.

Para evaluar la capacidad formadora de biofilm, las cepas de lactobacilos fueron crecidas en MRS durante 48 horas a 30°C sobre poliestireno, vidrio y acero inoxidable (AISI 304) y posteriormente determinar por CV. En la Figura 2.4 y a modo ilustrativo, se muestran las fotografías de la cuantificación de la formación de biofilm de las cepas de lactobacilos en placa de poliestireno.



Las cepas *Lb kefir* 83113, 8344, 5818, *Lb plantarum* 83114 y 8327 fueron capaces de adherirse y crecer sobre la superficie de poliestireno en las condiciones de cultivo mencionadas y unir el colorante como se muestra en la fotografía (Figura 2.6).

En la Figura 2.7 se muestran los resultados de formación de biofilm de lactobacilos expresados como valores de  $DO_{595}/cm^2$  obtenidos sobre poliestireno, vidrio y acero inoxidable.



Según se observa en la Figura 2.7, todos los lactobacilos excepto la cepa *Lb kefir* 8321, tuvieron capacidad de formación de biofilm en alguna de las superficies estudiadas cuando se cuantificó por CV. La mayor producción de biofilm se observó en poliestireno, siendo *Lb kefir* 5818 la cepa que alcanzó los mayores valores de  $DO_{595}$  /cm<sup>2</sup> cercanos a 8, seguida por *Lb plantarum* 83114 que alcanzó valores similares, observándose diferencias significativas con el resto de las superficies estudiadas. Otras cepas como *Lb delbrueckii sub. lactis* que no mostró formación de biofilm en poliestireno, alcanzó valores de  $DO_{595}$  /cm<sup>2</sup> cercanos a 3 cuando se utilizó acero inoxidable como superficie.

Todas las cepas de *Lb kefir* excepto la 8321, resultaron formadoras de biofilm sobre las tres superficies estudiadas, siendo el poliestireno el material sobre el cual la formación de biofilm fue significativamente mayor respecto a las otras dos superficies ( $p < 0.001$ ). Tanto los lactobacilos que poseen capa S como aquellos que no presentan estas estructuras en su superficie pudieron formar biofilm. No se encontró una relación entre la hidrofobicidad de la superficie celular y del sustrato ya que las cepas *Lb kefir* 8344 (hidrofóbica) y 5818 (moderadamente hidrofóbica), así como *Lb kefir* 83113 (hidrofílica) pudieron formar biofilm en superficies tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. Esto demuestra que en la formación de biofilm de lactobacilos puede deberse a múltiples factores además de la hidrofobicidad como la presencia de proteínas de superficie y la producción de polisacárido. Por otro lado, las cepas de *Lb plantarum* 83114 y 8327 que pueden producir EPS resultaron, aunque en distinta medida, productoras de biofilm en poliestireno y vidrio. Dertli *et al.* (2015) estudiaron el efecto de la producción de EPS de una cepa de *Lb johnsonii* sobre sus propiedades de superficie encontrando que el EPS de *Lb johnsonii* afecta la capacidad de producción de biofilm aunque no sería el único factor determinante en esta propiedad. Todo esto demuestra que las proteínas de superficie, la hidrofobicidad y la producción de EPS no explican por si mismos la formación de biofilm.

### **3. Co-agregación de lactobacilos con *Salmonella***

La co-agregación es un proceso mediante el cual bacterias genéticamente distintas se unen entre sí a través de moléculas específicas. Dicha interacción está mediada por

una proteína "adhesina" en un tipo de célula y un "receptor" de sacárido complementario en el otro (Rickard *et al.*, 2003). Los lactobacilos pueden evitar la adherencia de patógenos a la mucosa intestinal formando una barrera mediante la autoagregación y/o la co-agregación con otras bacterias (Collado *et al.*, 2007; Vlkov *et al.*, 2008). Del mismo modo, este mecanismo puede evitar que patógenos se adhieran y formen biofilm en superficies abióticas de (Twetman *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2010; Woo y Ahn, 2013).

En este trabajo, se estudió la capacidad de co-agregación de *Lb plantarum* 83114, *Lb kefir* 83113 y 8321 con las cepas de *Salmonella* previamente caracterizadas en el Capítulo 1. Los resultados de los ensayos de co-agregación se muestran en la Tabla 2.2, junto con los resultados de hidrofobicidad de los lactobacilos obtenidos anteriormente para poder correlacionar dichas propiedades superficiales.

Cepas de <i>Salmonella</i>	%Hidrofobicidad de <i>Salmonella</i>	% Co-agregación con <i>Lactobacillus</i>		
		8321 (%H=76 ± 2) <sup>1</sup>	83113 (%H=7 ± 0,5) <sup>1</sup>	83114 (%H=8 ± 1) <sup>1</sup>
SE 101	2,5 ± 1,0	6 ± 2 <sup>a</sup>	53 ± 6 <sup>b</sup>	43 ± 5 <sup>b</sup>
SE 105	2,1 ± 1,1	15,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	46 ± 18 <sup>b</sup>	28,5 ± 0,5 <sup>a</sup>
SE 106	1,6 ± 1,5	24 ± 12 <sup>a</sup>	69 ± 11 <sup>b</sup>	43 ± 3 <sup>c</sup>
SE 107	1,2 ± 1,1	15 ± 2 <sup>a</sup>	59 ± 13 <sup>b</sup>	32 ± 5 <sup>c</sup>
SE 112	27,5 ± 1,6	11,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	71 ± 3 <sup>b</sup>	34 ± 1 <sup>c</sup>
SE 113	20,6 ± 1,0	8 ± 6 <sup>a</sup>	57 ± 2 <sup>b</sup>	22 ± 1 <sup>c</sup>
SE 114	31,1 ± 5,8	8 ± 3 <sup>a</sup>	63 ± 1 <sup>b</sup>	28,1 ± 0,2 <sup>c</sup>
SE 115	44,3 ± 7,3	21 ± 5 <sup>a</sup>	57 ± 3 <sup>b</sup>	34,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
SE 116	41,6 ± 7,2	11 ± 3 <sup>a</sup>	42 ± 12 <sup>b</sup>	35,1 ± 0,8 <sup>b</sup>
ST 102	2,7 ± 1,0	25 ± 2 <sup>a</sup>	66 ± 5 <sup>b</sup>	37 ± 4 <sup>a</sup>
ST 103	6,4 ± 0,2	25 ± 4 <sup>a</sup>	72 ± 6 <sup>b</sup>	37 ± 1 <sup>a</sup>
ST 108	7,2 ± 5,0	42 ± 3 <sup>a</sup>	90,4 ± 0,6 <sup>b</sup>	51 ± 1 <sup>a</sup>
SG 104	1,9 ± 2,6	51,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	68 ± 15 <sup>b</sup>	30,5 ± 0,4 <sup>c</sup>
SG 109	1,4 ± 0,2	10 ± 1 <sup>a</sup>	55,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	27 ± 3 <sup>c</sup>
SG 110	1,6 ± 1,5	50 ± 3 <sup>a</sup>	71,7 ± 0,8 <sup>b</sup>	27,1 ± 0,9 <sup>c</sup>
SG 111	6,8 ± 1,7	38 ± 2 <sup>a</sup>	73 ± 1 <sup>b</sup>	28 ± 1 <sup>a</sup>

**Tabla 2.2 Co-agregación de lactobacilos con *Salmonella*** <sup>a, b, c</sup>: letras diferentes indican diferencias significativas entre las tres cepas de *Lactobacillus* (p<0.05). <sup>1</sup>Porcentaje de hidrofobicidad superficial según Figura 2.3. <sup>2</sup> Datos extraídos del Capítulo 1.

En la tabla se observa que las tres cepas de lactobacilos, tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, pueden interactuar con las cepas de *Salmonella*, con porcentajes de co-agregación variables entre 6 y 90%. Li *et al.* (2015) encontraron porcentajes de co-agregación entre 5% y 30% para 13 cepas de lactobacilos y *Salmonella spp.*, confirmando que es una característica cepa-específica.

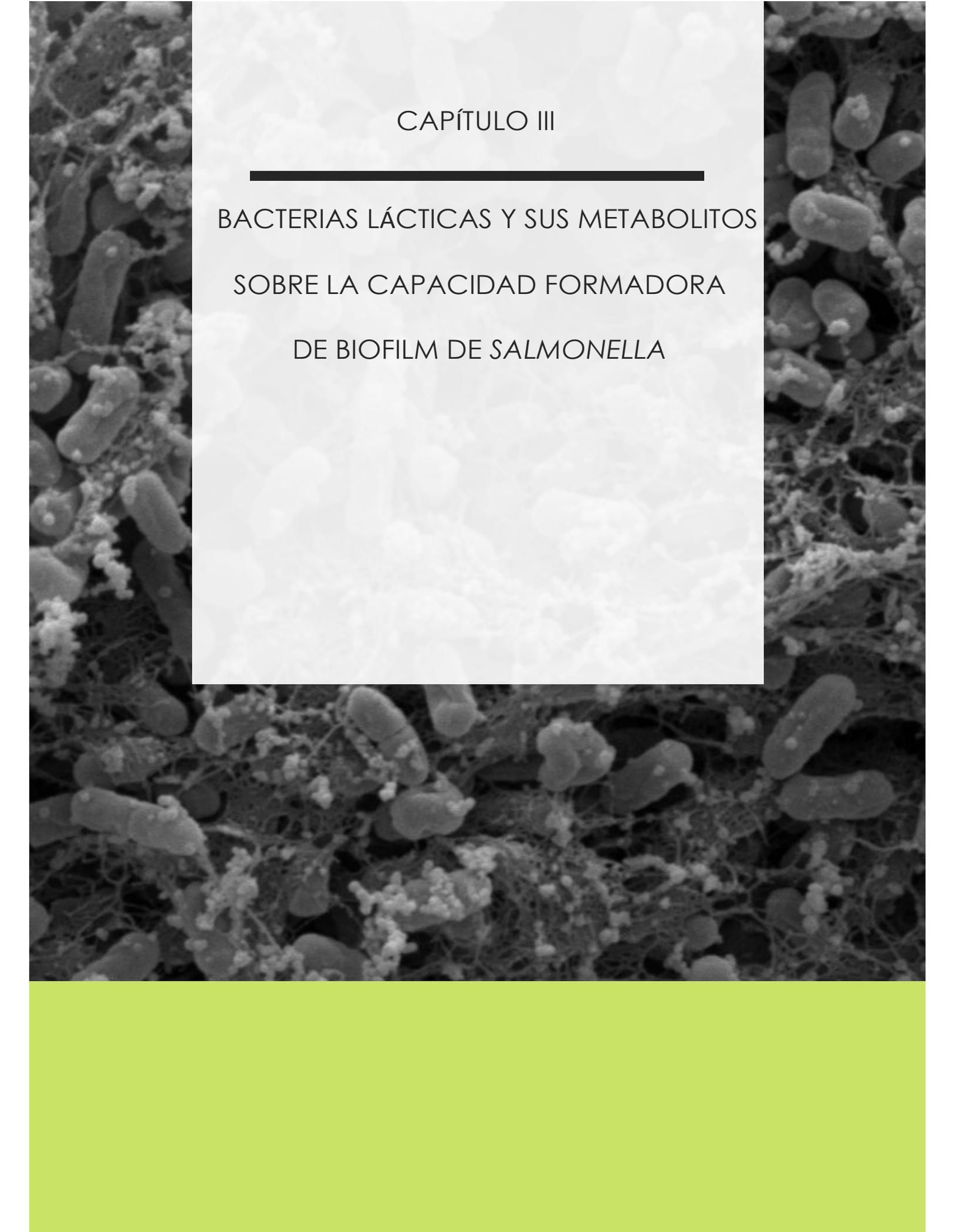
En nuestro estudio, la mayor co-agregación (90%) se observó para ST 108 con *Lb kefir* 83113 que había resultado hidrofílica, mostrando que en este caso la interacción no se relaciona con la hidrofobicidad superficial.

Para todas las cepas de *Salmonella*, la mayor capacidad de co-agregación se observó en la interacción con *Lb kefir* 83113, con valores entre 42% y 90%.

Beganović *et al.* (2011) estudiaron la co-agregación de una cepa de *Lb helveticus* con *S. Typhimurium* y sugirieron que las proteínas de capa S del lactobacilo podrían estar implicadas dado que la remoción de estas proteínas con LiCl 5M resultó en una disminución de la interacción entre las bacterias. Similares resultados fueron encontrados por Golowczyc *et al.* (2008) en cuyo trabajo la remoción de las proteínas de capa S de la superficie de *Lb kefir* disminuye la co-agregación con la levadura *Saccharomyces lipolytica*. Sin embargo, la cepa *Lb kefir* 83113 no co-agregó con esta levadura. Esto indica que la interacción entre los lactobacilos y *Salmonella* y los lactobacilos y la levadura son diferentes y que los mecanismos involucrados durante la co-agregación son complejos e intervienen varios factores además de las proteínas de superficie.

## Conclusiones

- Los resultados obtenidos para la capacidad de autoagregación y la hidrofobicidad de lactobacilos fue variable y no se encontró relación con la presencia ni de capa S ni de EPS.
- La formación de biofilms de los lactobacilos estudiados fue dependiente de las cepas y de las condiciones ambientales. El poliestireno fue la superficie sobre la cual la formación de biofilm fue mayor en todos los casos estudiados, excepto la cepa *Lb delbrueckii sub lactis* 133 que demostró mayor formación de biofilm en vidrio. El medio de crecimiento afectó en la formación de biofilm ya que fue mayor en MRS asociado a una mayor producción de matriz extracelular, mientras que en medio BHI la formación de biofilm se relacionó a un aumento en el número de células viables. Esto indicaría una mayor cantidad de biofilm a expensas de menor número de microorganismos viables quizás por un aumento en la matriz extracelular.
- La capacidad de co-agregación entre los lactobacilos y *Salmonella* resultó ser dependiente de la cepa y no hubo una relación entre la co-agregación y la hidrofobicidad superficial de las bacterias. Las cepas *Lb kefir* 83113 y 8321 y *Lb plantarum* 83114, cuyas propiedades superficiales de autoagregación e hidrofobicidad habían resultado diferentes y que presentan características distintas en cuanto a la producción de EPS y capa S, pudieron interaccionar con las cepas de *Salmonella* en diferente medida. La cepa SE 115 que había mostrado una mayor formación de biofilm, co-agregó con las tres cepas de lactobacilos estudiadas. De esta manera, resulta de interés el efecto de estas cepas sobre la capacidad inhibitoria de la formación de biofilm de *Salmonella*.

The background of the page is a grayscale scanning electron micrograph (SEM) showing a complex network of fibers and numerous rod-shaped bacterial cells. The cells are densely packed in some areas and more sparse in others, illustrating the structure of a biofilm. The text is centered over a white rectangular area in the upper half of the page.

## CAPÍTULO III

---

# BACTERIAS LÁCTICAS Y SUS METABOLITOS SOBRE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOFILM DE SALMONELLA

## CAPÍTULO 3

### Bacterias lácticas y sus metabolitos sobre la capacidad formadora de biofilm de *Salmonella*

Dada la capacidad de *Salmonella* de formar biofilms, lo que le confiere la habilidad de persistir durante un tiempo prolongado en el ambiente y que algunos tratamientos antimicrobianos no resultan efectivos para su erradicación, es necesario encontrar estrategias alternativas de control que sean seguras y efectivas para controlar la contaminación en ambientes de procesamiento de alimentos como se indicó en la Introducción General.

Las bacterias ácido lácticas (LAB) ejercen una fuerte actividad antagonista contra muchos microorganismos, incluidos los organismos que deterioran los alimentos, y pueden utilizarse como una alternativa para controlar la formación de biofilms de patógenos en las industrias alimentarias (Wu *et al.*, 2015, Petrova *et al.*, 2016; Matsubara *et al.*, 2016). La interacción entre lactobacilos y sus metabolitos y la formación de biofilms de microorganismos patógenos está siendo intensamente estudiada en los últimos años (Marianelli *et al.*, 2010; Aoudia *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2018). Trabajos recientes han demostrado que ciertas cepas de LAB tales como *Lb plantarum*, *Lb acidophilus*, *Lb casei*, *Lb paracasei*, *Lb rhamnosus* son capaces de reducir la formación de biopelículas por *Salmonella spp.* (Das *et al.*, 2013; Woo y Ahn, 2013; Chapman *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2016).

En este capítulo se estudiará el efecto de cepas de lactobacilos, sus proteínas de superficie y sus metabolitos presentes en sobrenadantes, en la interacción de la formación de biofilms de la cepa de *Salmonella* Enteritidis aislada de una granja avícola (SE 115) que demostró en el Capítulo 1 ser la cepa con la mayor capacidad de formar de biofilm en poliestireno.

## Objetivos

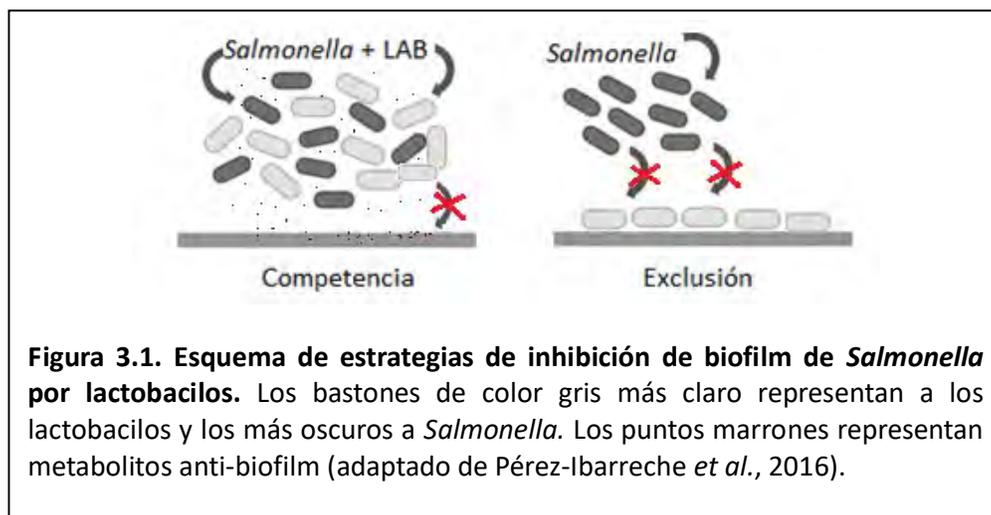
- Estudiar la formación de biofilm de *Salmonella* en presencia de lactobacilos tanto en ensayos de co-incubación como de pre-incubación
- Evaluar la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* mediante la incubación con sobrenadantes de lactobacilos
- Estudiar el efecto de las proteínas de superficie de lactobacilos sobre el desarrollo de biofilm de *Salmonella*
- Determinar el efecto de *Lb kefir* 8321 y sus metabolitos en la producción de los componentes de la matriz extracelular
- Determinar el efecto de la presencia de *Lb kefir* 8321 en la expresión de genes asociados a la formación de biofilm de *Salmonella*



# Resultados y discusión

## 1. Efecto de lactobacilos sobre biofilm de *Salmonella*

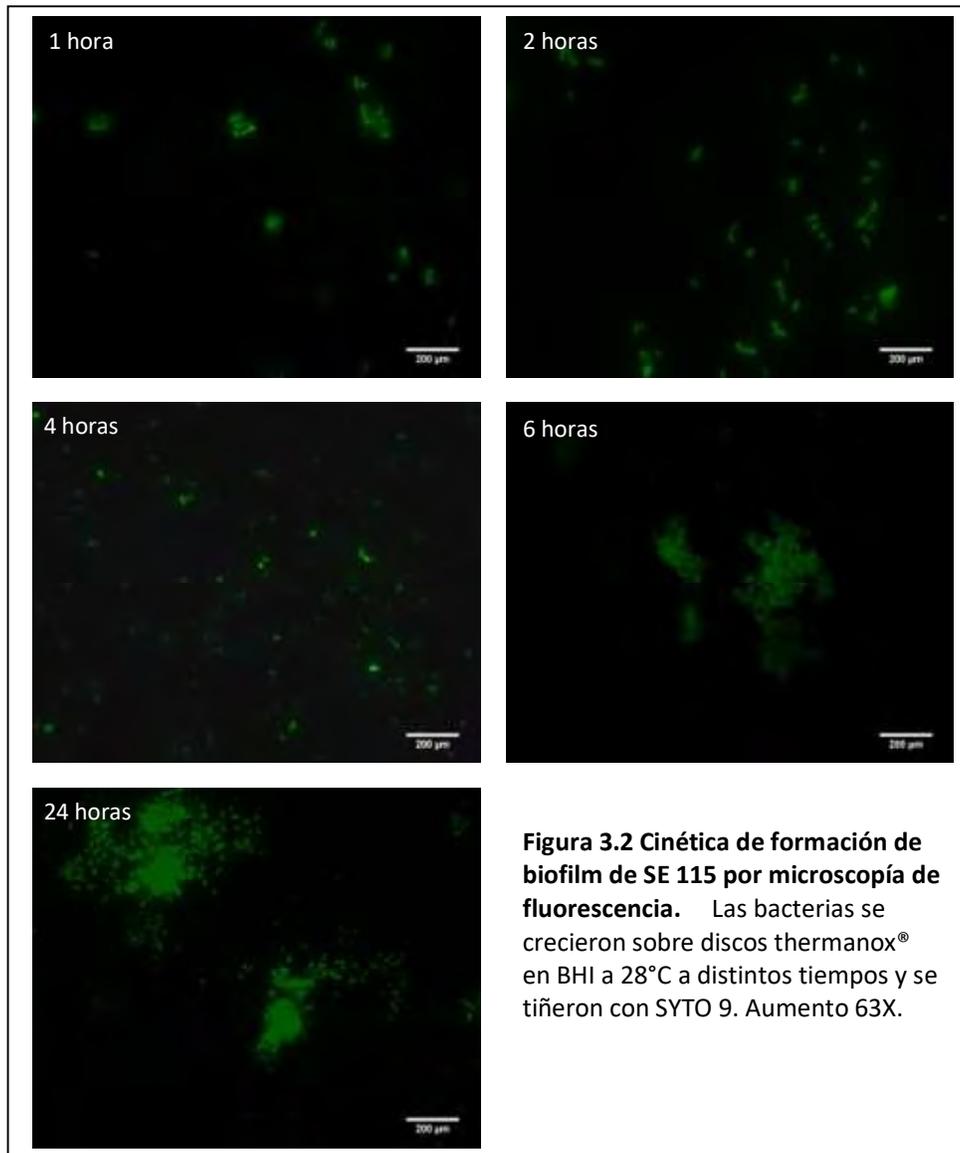
Indudablemente el proceso de adhesión bacteriana a una superficie representa una etapa crucial en el posterior desarrollo del biofilm sobre la misma como se describió anteriormente. Por lo tanto, la prevención de la adhesión puede ser un mecanismo efectivo para la inhibición del desarrollo de biofilms. Para evitar la interacción entre *Salmonella* y la superficie pueden pensarse dos estrategias: una basada en la co-agregación dirigida a interferir sobre sitios de unión de *Salmonella* y la segunda enfocada en impedir el acceso del patógeno a la superficie. De este modo, como se muestra en la Figura 3.1, la prevención de la formación de biofilm puede basarse en la interacción de *Salmonella* con lactobacilos mediante el mecanismo de co-agregación, así como también mediante la capacidad de inhibición de los lactobacilos y sus metabolitos mediante los mecanismos de competencia y exclusión. En la exclusión, los lactobacilos se encuentran adheridos sobre la superficie y de ésta manera impiden que los microorganismos patógenos se adhieran a la superficie y formen biofilm. En el mecanismo de competencia, las bacterias patógenas y los lactobacilos se encuentran en suspensión en el medio de cultivo creciendo juntas en estado planctónico y compiten por los sitios de unión.



**Figura 3.1. Esquema de estrategias de inhibición de biofilm de *Salmonella* por lactobacilos.** Los bastones de color gris más claro representan a los lactobacilos y los más oscuros a *Salmonella*. Los puntos marrones representan metabolitos anti-biofilm (adaptado de Pérez-Ibarreche *et al.*, 2016).

### 1.1 Cinética de formación de biofilm

Para evaluar el tiempo que le lleva a *Salmonella* adherirse y formar biofilm, se estudió la cinética de formación de biofilm de la cepa SE 115. Para ello, se evaluó la formación de biofilm en el tiempo mediante microscopía de fluorescencia utilizando SYTO 9 para la tinción de las bacterias. Los resultados se muestran en la Figura 3.2.



Como se observa en las microfotografías, a medida que transcurre el tiempo de incubación un mayor número de bacterias se adhirieron a la superficie y crecieron. Desde la primera hora de incubación se observa que esta cepa es capaz de adherirse al sustrato,

aunque lo que se observan son bacterias individuales o pequeños agregados. Al cabo de 6 horas de incubación, la formación de clústeres de bacterias adheridas a la superficie se hace notable y luego de 24 horas de incubación se observó el crecimiento de las bacterias en biofilm, exhibiendo un mayor número de agregados adheridos al sustrato, evidenciado por la observación de clústers compactos de bacterias de mayor densidad.

Como se informó anteriormente, la migración bacteriana a lo largo de la superficie puede ser el resultado de la motilidad debido a la contracción impulsada por estructuras como pili tipo IV (O'Toole y Kolter, 1998). Este movimiento está involucrado en la rápida colonización de una superficie dada y permite el desarrollo de colonias con estructuras complejas (Prieto *et al.*, 2013). La motilidad superficial, la formación de biofilms y la invasión del huésped son algunas de las manifestaciones de las respuestas funcionales a la colonización superficial. Las bacterias pueden censar la superficie de crecimiento directamente a través del contacto físico o indirectamente a través de la proximidad de otras bacterias. Las señales extracelulares que provocan la expresión de nuevos genes incluyen autoinductores, aminoácidos, péptidos, proteínas y carbohidratos (Harshey, 2003). Por lo tanto, resulta muy importante tener en cuenta la rápida adhesión y formación del biofilm de *Salmonella* sobre la superficie para la aplicación de tratamientos que prevengan la formación de estas estructuras.

### **1.2 Efecto de los lactobacilos en la formación de biofilm de *Salmonella***

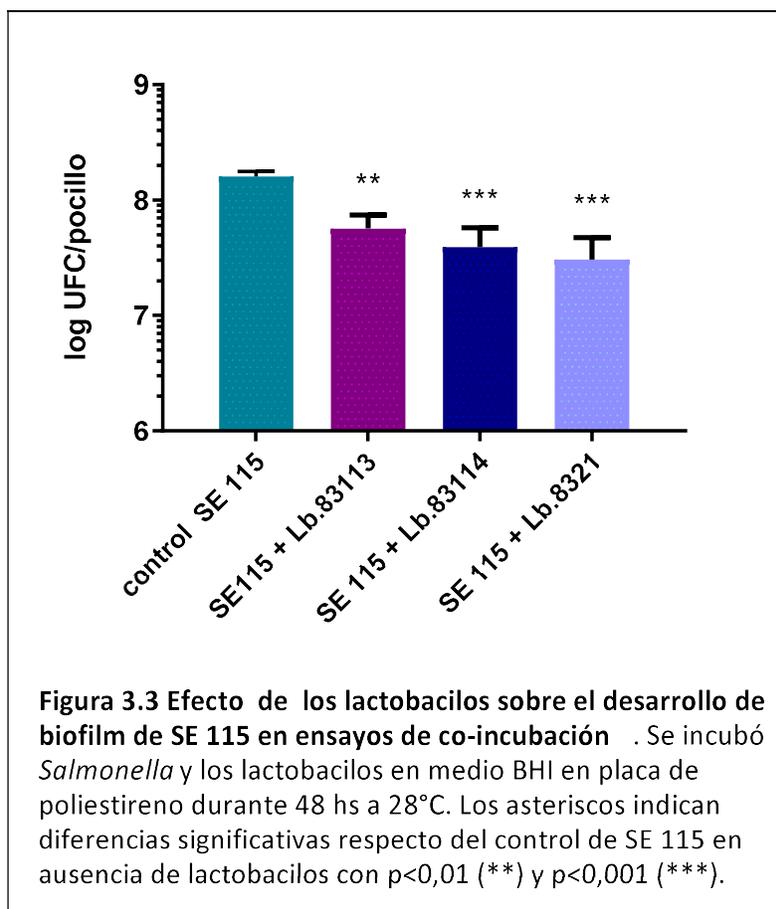
Se ha publicado que algunas bacterias ácido lácticas (LAB) pueden reducir la adhesión, la colonización y la formación de biofilm de patógenos a través de la competición por los sitios de unión al sustrato y los nutrientes disponibles, así como también por la producción de metabolitos como ácidos orgánicos y biosurfactantes y por mecanismos como la co-agregación (Collado *et al.*, 2007; Tahmourespour y Kermanshahi, 2011; García-Cayueta *et al.*, 2014). Das *et al.* (2013) informaron que una cepa de *Lb plantarum*, aislada de un producto alimenticio tradicional de la India, inhibió efectivamente la capacidad de crecimiento, invasión y formación de biopelículas de *Salmonella* Enteritidis. Gómez *et al.* (2016) demostraron que LAB formadores de biofilm eran efectivos para el control de biofilms de *Listeria monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7 por mecanismos de exclusión.

Como se determinó en el Capítulo 2, las cepas de *Lb kefir* 83113 y 8321 y *Lb plantarum* 83114, con diferentes propiedades superficiales, fueron capaces de co-agregar en

distinta medida con la cepa SE 115, encontrándose valores de 57%, 21%, 34% respectivamente. Debido a los antecedentes mencionados, se seleccionaron estas cepas de lactobacilos para evaluar el efecto en la formación de biofilm de SE 115.

### 1.2.1 Co-incubación

Para evaluar si los lactobacilos ejercen un efecto sobre el desarrollo del biofilm, las cepas de lactobacilos seleccionadas y SE 115 se crecieron juntas en BHI, un medio de cultivo donde ambos microorganismos son capaces de crecer. Luego del ensayo se evaluó la formación de biofilm y los resultados se expresaron como log UFC/pocillo.



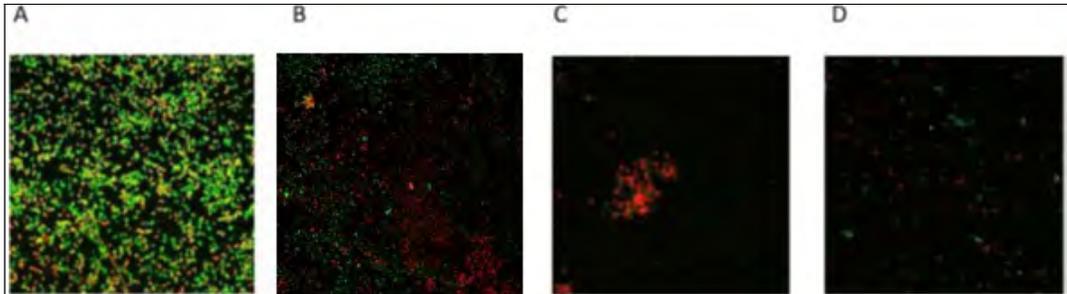
Como se observa en la Figura 3.3, la formación de biofilm de SE 115 se redujo significativamente cuando esta cepa se co-incubó con *Lb kefir* 83113 ( $p < 0,01$ ) y este efecto fue mayor cuando SE 115 se co-incubó con *Lb kefir* 8321 y *Lb plantarum* 83114 ( $p < 0,001$ ) indicando una relación competitiva entre estas bacterias y un efecto inhibitorio dependiente de la cepa. La reducción de la formación de biofilm de SE 115

fue del 65% para la co-incubación con *Lb kefir* 83113, 75% para la co-incubación con *Lb plantarum* 83114 y del 80% con *Lb kefir* 8321.

Dado que las tres cepas de *Lactobacillus* tienen diferentes porcentajes de co-agregación con SE 115 y fueron capaces de reducir significativamente la formación de biofilm de *Salmonella*, podemos concluir que no hay una relación directa entre la co-agregación y la inhibición de la formación de biofilm de SE 115 indicando que otros mecanismos estarían implicados. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la Figura 2.5, podemos hipotetizar que los lactobacilos podrían competir por los sitios de unión a la superficie o estar presentes en el biofilm junto con SE 115 debido a que los tres lactobacilos pudieron formar biofilm en BHI sobre poliestireno cuando se cuantificó por recuento de viables. Además, las bacterias pueden competir por los nutrientes disponibles, limitando el crecimiento de *Salmonella*. Se ha propuesto que las proteínas de capa S podrían tener un rol en la inhibición de la formación de biofilm ya que estas proteínas pueden interactuar con la superficie de SE 101 interfiriendo en la interacción con la superficie de células intestinales en cultivo (Golowczyc *et al.*, 2007). En este trabajo la inhibición del biofilm por parte de los lactobacilos resultó significativa tanto para las cepas de *Lb kefir* que poseen capa S como para la cepa *Lb plantarum* que no posee estas proteínas. Esto indica que pueden actuar otras estructuras o metabolitos de los lactobacilos además de las proteínas de capa S. Trabajos previos indican que existen múltiples mecanismos involucrados en la inhibición de biofilms de patógenos por lactobacilos. Por ejemplo, Rossoni *et al.* (2018) encontraron que la co-incubación de *Lb paracasei*, *Lb rhamnosus* y *Lb fermentum* inhibió la formación de biofilm de *Candida albicans* por disminución de la expresión de genes asociados a la producción de biofilms. También ha sido demostrado que bacteriocinas, biosurfactantes, exopolisacáridos, ácidos orgánicos y otros metabolitos tienen actividad anti-biofilm (Kim y Kim, 2009; Fracchia *et al.*, 2010; Pérez-Ibarreche *et al.*, 2016) lo que sugiere que existen mecanismos diferentes involucrados en la inhibición de biofilms por lactobacilos.

Por otro lado, el efecto inhibitorio de los lactobacilos sobre el biofilm de SE 115 durante la co-incubación se estudió mediante microscopía láser confocal mediante tinción con SYTO 9 (verde) y Ioduro de propidio (rojo), que tiñen células vivas y células muertas respectivamente. Esta técnica se ha utilizado ampliamente para estudiar la

estructura, la composición y el metabolismo de los biofilms en varios microorganismos diferentes (Almeida *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011; Bodor *et al.*, 2011) ya que permite realizar un análisis directo sobre la estructura biológica sin dañarla.

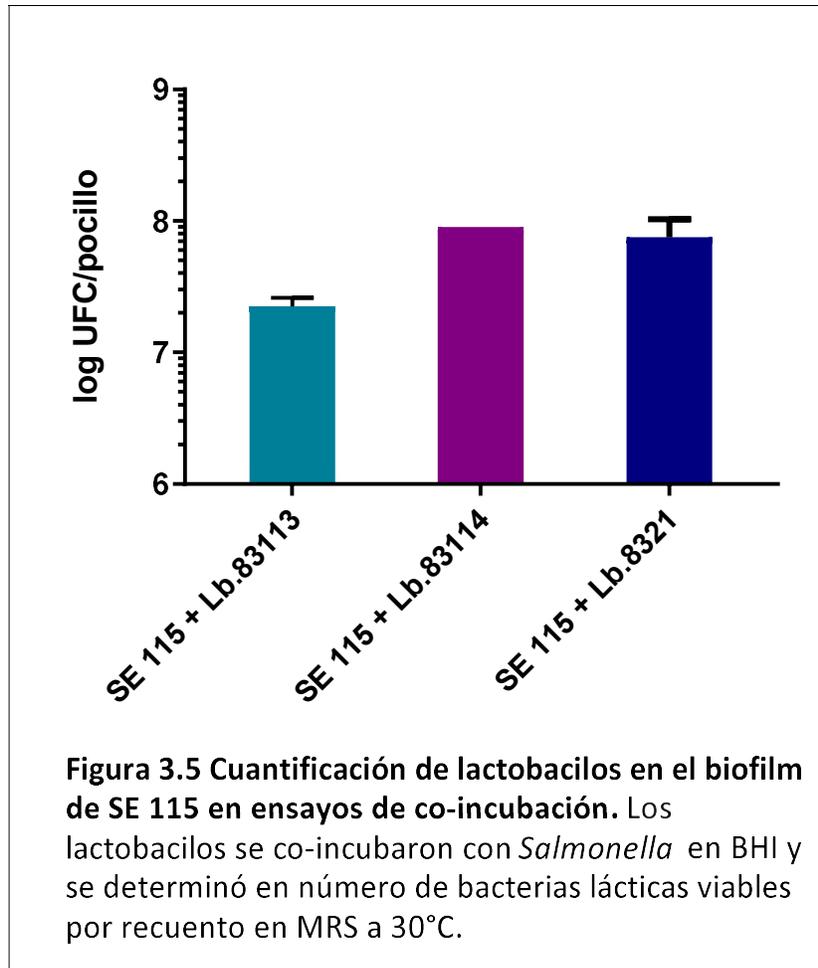


**Figura 3.4 Efecto de la co-incubación de lactobacilos sobre el biofilm de *Salmonella* por Microscopía láser confocal** Microfotografías de la formación de biofilm de SE 115 sobre discos thermanox en BHI a 28°C 48 horas teñido con SYTO9 e IP. (A) SE 115 (control), (B) co-incubación con *Lb. kefir* 8321, (C) co-incubación con *Lb. kefir* 83113, (D) co-incubación con *Lb. plantarum* 83114. Aumentos 63X.

Como se muestra en la Figura 3.4, el biofilm formado por SE 115 resultó en una película homogénea o césped de bacterias mayormente viables con las células distribuidas a lo largo de la superficie o formando clusters de bacterias. Sin embargo, en presencia de lactobacilos, se observó una inhibición del biofilm y un aumento relativo de bacterias no viables (rojo).

Resultados similares fueron reportados por McMillan *et al.* (2011) donde el biofilm de *E. coli* uropatógena desafiada con cepas de *Lb. reuteri* y *Lb. rhamnosus* causó una marcada disminución en la densidad celular y la muerte de células bacterianas en el biofilm. Los autores encontraron además que los lactobacilos se introducen dentro del biofilm bacteriano causando muerte celular y proponen que la disrupción del biofilm puede deberse a la producción de ácido, biosurfactantes y/o bacteriocinas como se observó en otros trabajos (Reid *et al.*, 1999; Cadieux *et al.*, 2009). También encontraron que la inclusión de *Lb. reuteri* y *Lb. rhamnosus* en el biofilm es independiente de la hidrofobicidad de los lactobacilos y por lo tanto otras fuerzas permiten la interacción. Para determinar la presencia de lactobacilos en el biofilm de SE 115 se realizaron

recuentos de viables en medio MRS a las 24 horas de incubación, es decir en la mitad del tiempo del ensayo, como se muestra en la Figura 3.5.

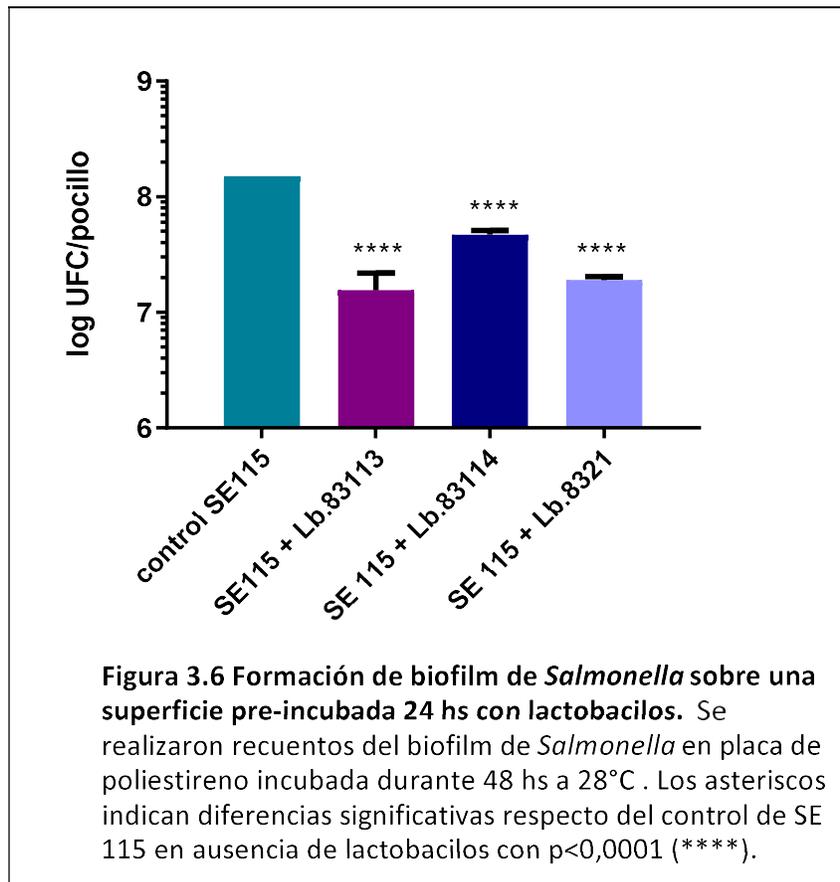


Estos resultados indican que los lactobacilos están formando parte del biofilm a las 24 horas de co-incubación. Dado que *Lb kefir* 8321 había resultado hidrofóbica mientras que *Lb kefir* 83113 y *Lb plantarum* 83114 eran hidrofílicas (Figura 2.3), la interacción con *Salmonella* en el biofilm depende de otras características como la co-agregación, independientemente de la hidrofobicidad superficial de las bacterias. La disrupción del biofilm en presencia de los lactobacilos luego de 48 horas observada por microscopía láser confocal en la Figura 3.4 podría indicar que hay una penetración de los lactobacilos en el biofilm de SE 115 resultando en la pérdida de su estructura y viabilidad. Esto puede deberse a la producción de compuestos por parte de los

lactobacilos que inhiben el desarrollo de SE 115, la competencia por los nutrientes o el sitio de adhesión al sustrato o bien a una modificación en la expresión de los genes vinculados a la producción de biofilm de *Salmonella*. James *et al.* (2016) encontraron que la incubación de *Lb plantarum*, *Lb helveticus* y *Streptococcus salivarius* y sus sobrenadantes libres de células reducen hasta 65% el biofilm de *Candida albicans* y que los sobrenadantes disminuyen la expresión de genes críticos para la transición levadura-hifa, la formación de biofilm, la invasión de tejidos y el daño celular.

### 1.2.2 Pre-incubación

Se estudió el efecto de las cepas de lactobacilos *Lb kefir* 83113 y 8321 y *Lb. plantarum* 83114 pre-incubadas (24 hs a 28°C) y que permanecieron adheridas sobre la superficie de poliestireno en medio BHI sobre la capacidad de formación de biofilm de SE 115. El objetivo de estos estudios fue evaluar si los lactobacilos podrían ejercer una acción preventiva sobre la formación del biofilm adheriéndose a la superficie bloqueando los sitios de adhesión disponibles. Los resultados del recuento de viables de SE 115 en el biofilm se muestran en la Figura 3.6.



Como se observa en la Figura 3.6, la adhesión de las tres cepas evaluadas sobre la superficie de la placa disminuyó significativamente la formación de biofilm de SE 115 respecto del control sin lactobacilos. Mientras que los recuentos del control de SE 115 eran  $1 \times 10^8$  UFC/pocillo, luego de los tratamientos el recuento fue de  $1-4 \times 10^7$  UFC/pocillo lo que representa una reducción de la formación de biofilm de 90%, 87% y 69% para la pre-incubación de la superficie con *Lb kefir* 83113, *Lb plantarum* 83114 y *Lb kefir* 8321 respectivamente.

Esta inhibición fue mayor que la obtenida en la co-incubación de lactobacilos donde los recuentos obtenidos fueron de  $5-7 \times 10^7$  UFC/pocillo con porcentajes de inhibición de 65% (*Lb kefir* 83113), 75% (*Lb plantarum* 83114) y 80% (*Lb kefir* 8321). Los resultados obtenidos coinciden con el trabajo publicado por Woo y Ahn (2013) que demostraron que la pre-incubación durante 24 hs de *Lb acidophilus*, *Lb casei* y *Lb paracasei* es más efectiva en la inhibición de biofilms de *Salmonella* que la co-incubación, alcanzando valores de disminución de recuento de células viables en el biofilm de 1 orden de logaritmo. En el mismo sentido, Das *et al.* (2013) demostraron que la co-incubación de *Lb plantarum* y *Salmonella* Enteritidis no inhibe la formación de biofilm de *Salmonella* mientras que la pre-incubación durante 1 hora la reduce significativamente. Estos autores demostraron también que el sobrenadante de *Lb plantarum* tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *Salmonella* debido a la producción de ácido láctico y de otros metabolitos presentes en el cultivo. La pre-incubación de lactobacilos sobre la superficie de poliestireno permite su adhesión antes de la inoculación de *Salmonella* lo que podría impedir que ésta se una a la superficie con la consecuente formación del biofilm. Entre los mecanismos propuestos en la inhibición de la formación de biofilm, las cepas de lactobacilos pueden producir diversos compuestos antimicrobianos que incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etanol, diacetilo y bacteriocinas, que pueden interferir con el crecimiento del patógeno, prevenir la unión de otras especies o incluso provocar el desprendimiento de células de las estructuras del biofilm (Westerlund *et al.*, 2006; Rendueles y Ghigo, 2012; Arena *et al.*, 2017; Camargo *et al.*, 2018). Además, los exopolisacáridos producidos por algunas cepas de lactobacilos también pueden inhibir la formación de biopelículas por patógenos (Kim *et al.*, 2009).

De esta manera, resulta importante estudiar el efecto de los sobrenadantes de cultivos de lactobacilos sobre la capacidad de formación de biofilm.

## **2. Efecto de los sobrenadantes libres de células de lactobacilos sobre el biofilm de *Salmonella***

Estudios previos demostraron que el sobrenadante de las cepas de *Lb kefir* crecidas en medio MRS tienen un efecto bactericida sobre *Salmonella* Enteritidis, que no se observa con medio de cultivo acidificado artificialmente, indicando la presencia de otros metabolitos inhibidores presentes en esta fracción del cultivo (Golowczyc *et al.*, 2007). Sumado a esto, estudios previos realizados por otros autores han demostrado un efecto inhibitorio del sobrenadante de *Lactobacillus* sobre la formación de biopelículas por *K. pneumonia* (Al-Mathkury *et al.*, 2012), del sobrenadante de *Lb fermentum* sobre el crecimiento y la formación de biofilms de *Klebsiella* (Maldonado y Silva, 2007) y que el EPS presente en el sobrenadante de lactobacilos tiene actividad antibacteriana y anti-biofilm sobre patógenos como *S. aureus*, *E. coli*, y *S. flexneri* (Kim *et al.*, 2009; Li y Shah, 2014; Wang *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluaron los sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos de tres cepas de lactobacilos en medio de cultivo BHI o MRS a valores de pH de cosecha y pH neutralizado con NaOH según se muestra en Tabla 3.1.

Por sus diferentes propiedades se seleccionaron las cepas *Lb plantarum* 83114, que produce grandes cantidades de ácidos orgánicos principalmente ácido láctico (63 mM en medio MRS) (Golowczyc, 2008), *Lb. kefir* 8321, la cual posee proteínas de capa S que están presentes en el sobrenadante (Garrote *et al.*, 2000) y *Lb. delbreuckii* subsp. *lactis* 133 que posee actividad proteolítica (Hugo *et al.*, 2014). Ha sido demostrado que la actividad proteasa extracelular puede tener actividad anti-biofilm (Marsh, 2010).

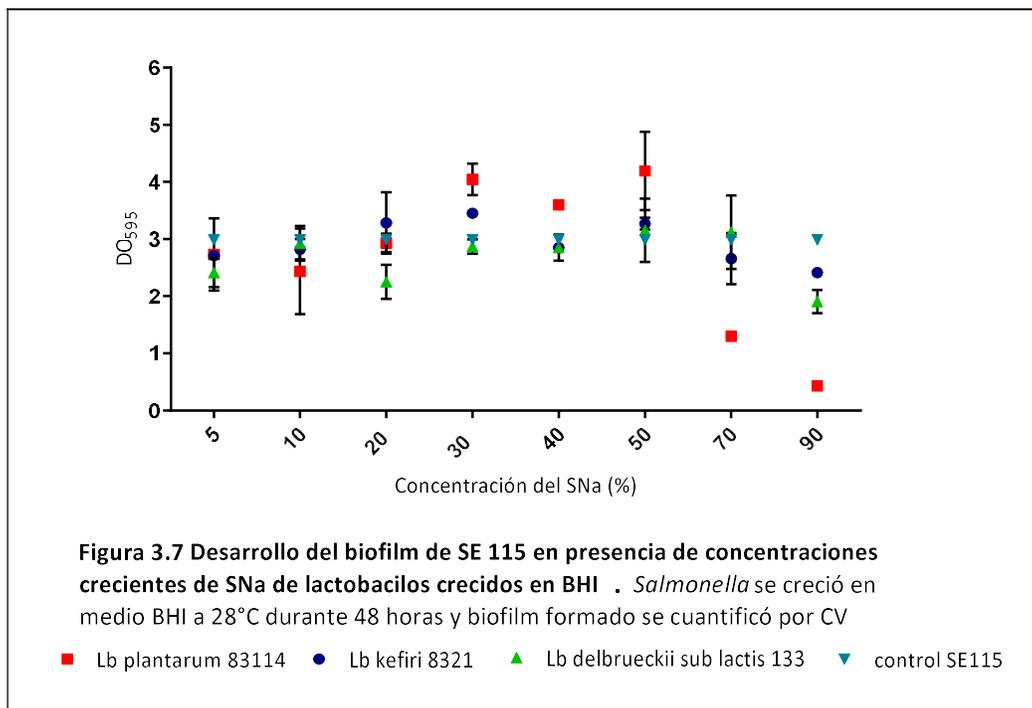
Sobrenadante lactobacilos (SN)	Medio de cultivo de lactobacilos	
	BHI	MRS
<i>Lb plantarum</i> 83114	4,9 ± 0,2	3,8 ± 0,1
<i>Lb kefir</i> 8321	6,6 ± 0,3	4,7 ± 0,1
<i>Lb. delbreuckii</i> subsp. <i>lactis</i> 133	5,7 ± 0,2	4,1 ± 0,3

**Tabla 3.1. Valores de pH alcanzados en el cultivo de lactobacilos.** Las bacterias se crecieron a 30°C durante 48 horas en medio MRS o BHI. Los resultados muestran el promedio y la desviación estándar de tres cultivos de cada cepa.

En las siguientes secciones se presentan los resultados de la formación de biofilm de SE 115 cuantificado por cristal violeta en presencia de sobrenadantes de los lactobacilos a pH de cosecha (ácidos) y neutralizados (pH=7,0).

### 2.1 En presencia de sobrenadantes ácidos (SNa)

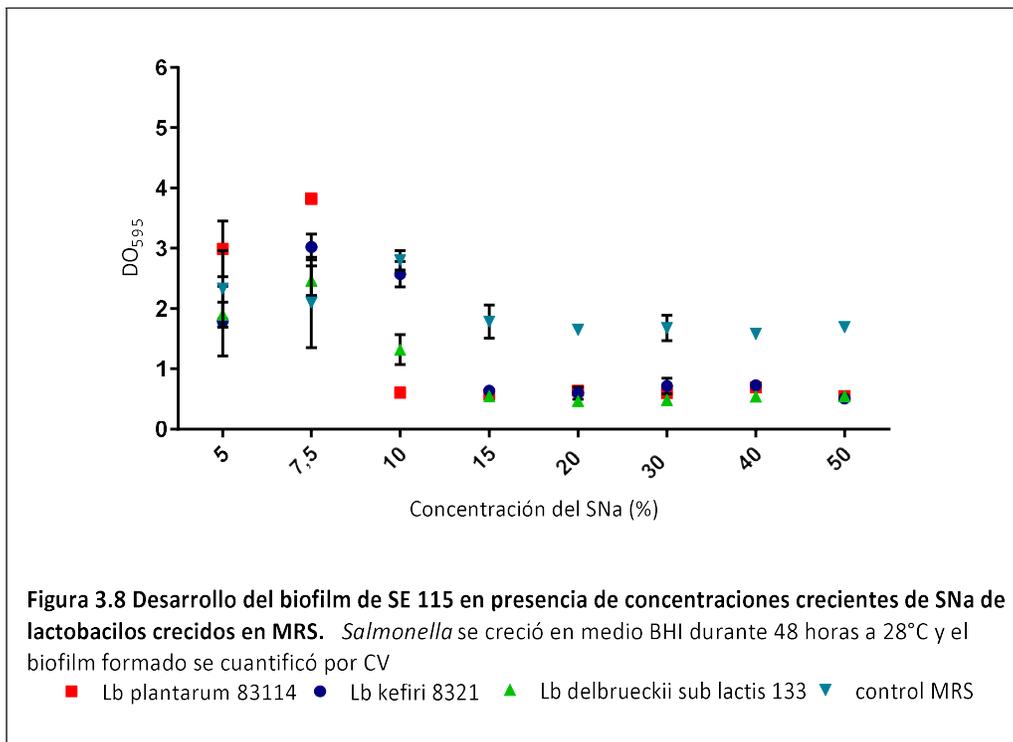
Se evaluó la formación de biofilm de SE 115 en presencia de concentraciones crecientes de los SNa de lactobacilos crecidos en medio BHI a pH de cosecha sobre la formación de biofilm en placa de poliestireno como se muestra en la Figura 3.7.



El SNa de *Lb plantarum* 83114 mostró un marcado efecto inhibitorio de la formación de biofilm de *Salmonella* a partir de una concentración de 70% con respecto al control de *Salmonella* en medio BHI, llegando a una inhibición casi total cuando la concentración del SNa fue del 90%. Sin embargo, el SNa de *Lb. delbrueckii subs. lactis* 133 mostró inhibición a 90% aunque no alcanzó a inhibir completamente la formación

de biofilm. El SNa de *Lb kefir* 8321 no modificó significativamente la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* en estas condiciones. Estos resultados indican que a un pH más ácido la disminución de la formación de biofilm de *Salmonella* es mayor. Esto coincide con los resultados obtenidos por Ćirković *et al.* (2007) que concluyeron que los ácidos orgánicos tienen una mayor capacidad de reducción del biofilm a valores de pH decrecientes.

También se estudió el efecto del sobrenadante de lactobacilos crecidos en MRS donde el pH de cosecha alcanzado fue menor para las tres cepas de lactobacilos evaluadas (Tabla 3.1). Los resultados los SN sobre el desarrollo de biofilm de SE 115 se muestran en la Figura 3.8.



Se puede observar que a partir de la adición de 10% de SNa se produjo una marcada inhibición de la formación de biofilm de SE 115, llegando a disminuir en casi 2 unidades de DO<sub>595</sub>. Se observa además que el control de MRS también tuvo un efecto inhibitorio en la formación de biofilm a partir de una concentración del 10%, aunque se llega a un máximo de inhibición en 15% a partir del cual no se logra modificar la capacidad de

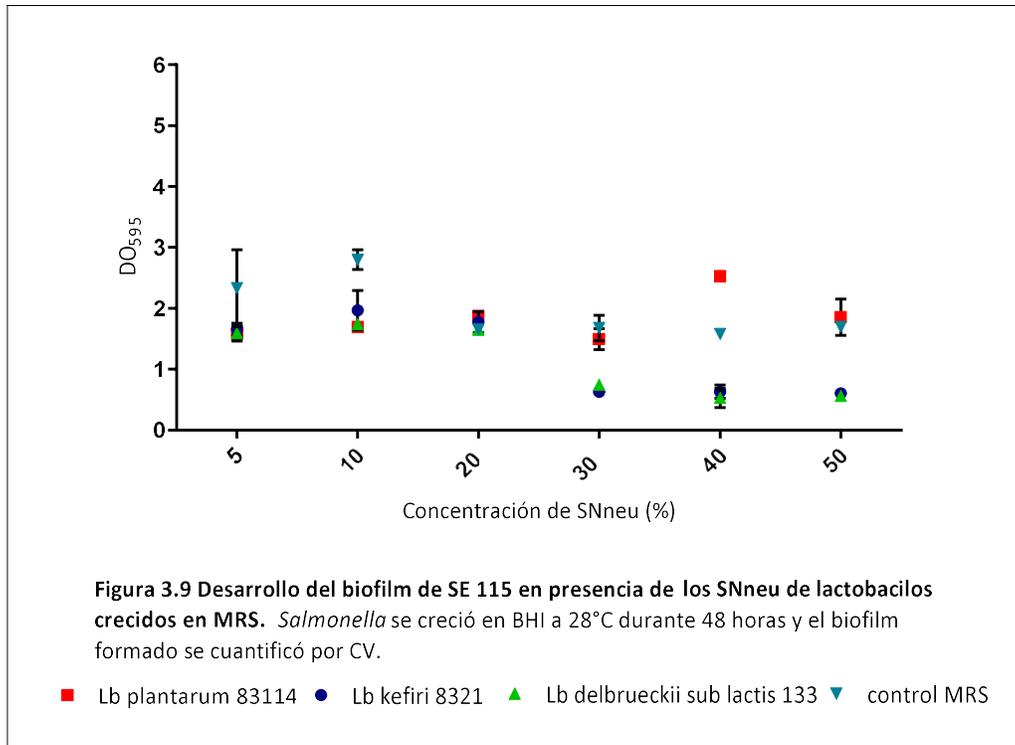
formación de biofilm de *Salmonella*. Probablemente, la sustitución de medio de cultivo de *Salmonella* por medio MRS que en su composición contiene Tween 80 o algún otro componente del medio de cultivo, podría resultar inhibitorio para el crecimiento de *Salmonella*.

En el caso de los SNa obtenidos a partir de los cultivos de las bacterias lácticas crecidas en MRS, donde los valores de pH alcanzados son inferiores a 5, se observó un efecto de inhibición de la formación de biofilm a concentraciones de SNa de 15%, mientras que el sobrenadante de *Lb plantarum* 83114 cuyo pH es inferior a 4, mostró inhibición del desarrollo de biofilm a partir de concentraciones de 10% SNa. Esto podría indicar que el pH es crítico para la formación de biofilm de SE 115 y que otros metabolitos del SN también podrían inhibir. Lianou y Koutsoumanis (2012) encontraron que a un valor de  $\text{pH} \leq 4,5$ , *Salmonella* de diferentes serovariedades no son capaces de formar biofilms. Un estudio sobre el efecto del pH en la formación de biofilm de *Salmonella* indica que el pH óptimo es de 6-6,5 y disminuye la formación de biofilm a medida que el pH disminuye, llegando un mínimo a  $\text{pH} \leq 4$  a partir del cual se inhibe el crecimiento de la bacteria (Dimakopoulou-Papazoglou *et al.*, 2016). En otro trabajo, un  $\text{pH}=6$  resultó óptimo para la formación de biofilm de una cepa de referencia de *Salmonella* mientras que esta capacidad disminuyó con el aumento de acidez del medio (Speranza *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la expresión de genes vinculados a la formación de biofilm son fuertemente dependientes de las condiciones ambientales (Gerstel y Romling, 2001). También los componentes de la superficie celular tal como las fimbrias curli y otras proteínas de superficie involucradas en la formación de biofilm de *Salmonella* pueden estar afectados por el pH del medio.

Estudiando la concentración inhibitoria de los SNa en MRS en tubo se observó una CIM de 15% SNa para *Lb plantarum* 83114, para *Lb kefir* 8321 del 40% y para *Lb delbrueckii sub lactis* 133 resultó del 10% SNa según se muestra en el Anexo. Dado que la inhibición del biofilm de SE 115 con el SNa *Lb kefir* 8321 se observó a concentraciones menores que la CIM, podemos decir que la menor formación de biofilm no se debe por una inhibición del crecimiento de la bacteria.

## **2.2 En presencia de sobrenadantes neutralizados (SNneu)**

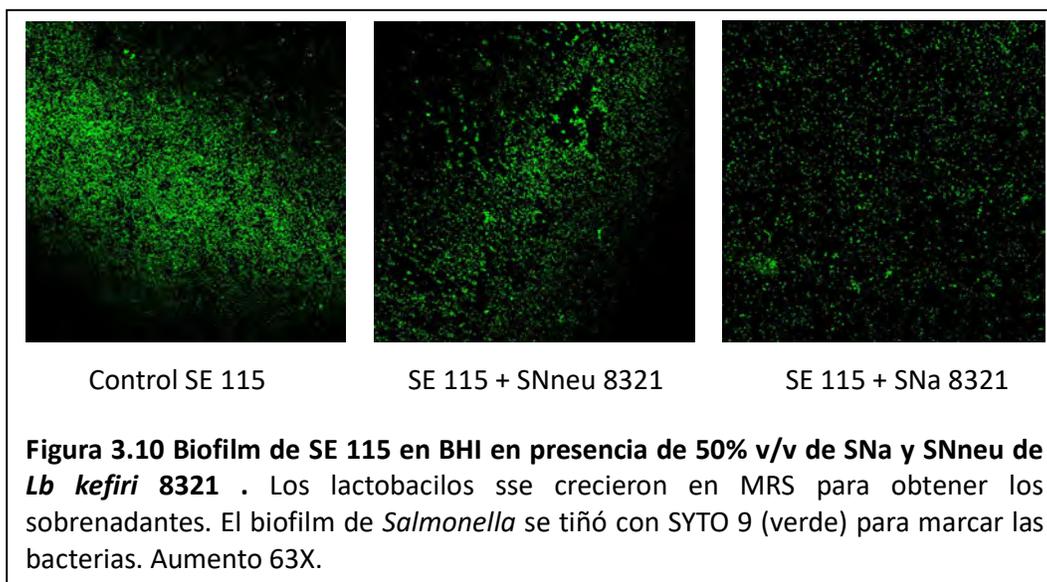
Para determinar si el efecto inhibitorio de los sobrenadantes se debe a la presencia de ácidos o de otros metabolitos presentes en el sobrenadante, se neutralizaron llevando a pH=7 mediante el agregado de NaOH 5N.



Como se observa en la Figura 3.9, el SNneu de *Lb plantarum* 83114 no redujo la formación de biofilm de *Salmonella*, por lo que el efecto inhibitorio observado con el SNa de esta cepa puede deberse a un menor pH. Sin embargo, los SNneu de *Lb kefirii* 8321 y *Lb delbrueckii sub. lactis* 133 lograron inhibir la formación de biofilm de *Salmonella* a partir de una concentración del 30%, alcanzando valores de DO=0,5. Estas observaciones indicarían que otros metabolitos presentes en el medio, independientemente del valor de pH, son responsables de dichos efectos. Otros estudios realizados también en nuestro laboratorio demostraron que las proteínas de capa S de los lactobacilos pertenecientes a la especie *Lb kefirii* se encuentran en el sobrenadante de cultivo en cantidades significativas (Mobili, 2008), y que estas proteínas pueden interactuar con la superficie de *Salmonella* cuando se co-incuban durante 1 hora a 37°C (Golowczyc, 2008). Si bien la presencia de proteínas de capa S de *Lb kefirii* 8321 podrían estar implicada en la inhibición de la formación de biofilm de

*Salmonella*, la ausencia de estas estructuras en *Lb. delbrueckii sub. lactis* 133 cuyo efecto inhibitorio es similar, indica que otros metabolitos pueden intervenir. En otro estudio, los sobrenadantes de *Lb plantarum* y *Lb pentosus* en concentraciones inferiores a las inhibitorias fueron capaces de disminuir la formación de biofilm de *P. aeruginosa* y *B. cereus* (Khiralla *et al.*, 2015). Los autores proponen que pueden estar presentes sustancias inhibitorias del *quorum sensing* tal como ha sido descrito por Goldstone *et al.* (2012).

El efecto del SN sobre la formación de biofilm de SE 115 fue estudiado también por microscopía confocal. La Figura 3.10 muestra el biofilm de SE 115 desarrollado en medio BHI cuando se reemplazó el 50% del medio de cultivo por igual volumen de SNa y SNneu de *Lb kefir* 8321 crecida en MRS o por medio MRS (control).



Como se observa en las microfotografías, tanto el SNa como el SNneu tuvieron un efecto inhibitorio sobre el biofilm de SE 115 ya que resultó en una disminución de la cantidad bacterias viables (verdes) respecto del control. Este efecto fue mayor para el SNa que el SNneu.

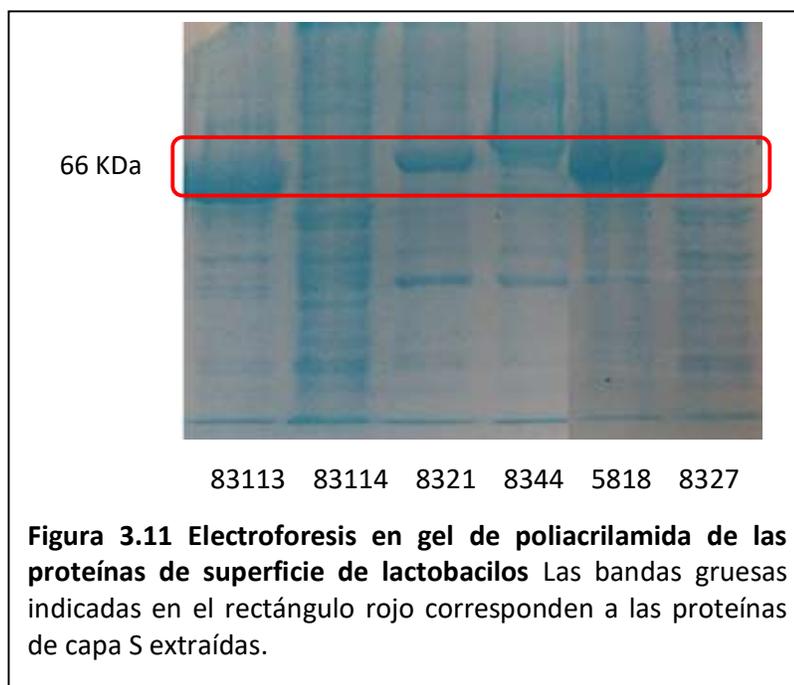
Maldonado *et al.* (2007) encontraron que una cepa de *Lb fermentum* crecida en MRS así como sobrenadantes ácidos y neutralizados con NaOH inhibieron el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* formadora de biofilm y que el sobrenadante ácido inhibe en mayor grado el biofilm de *Klebsiella*. Los autores proponen que los ácidos orgánicos

pueden inhibir el desarrollo del patógeno y que otros metabolitos, como biosurfactantes presentes en el sobrenadante neutro, pueden inhibir en menor medida la formación de biofilm. La importancia de otros metabolitos además de los ácidos para la inhibición del biofilm de otras especies bacterianas fue demostrada (Söderling *et al.*, 2010; Matsubara *et al.*, 2016; Ceresa *et al.*, 2015) quienes propusieron que la presencia de exometabolitos de lactobacilos en el sobrenadante podrían modificar la superficie de la bacteria impidiendo agruparse y formar una estructura organizada.

### 3. Efecto de las proteínas de superficie de lactobacilos

#### 3.1 Obtención de las proteínas de superficie de lactobacilos

Los sobrenadantes de cultivos de *Lb. kefir* en MRS contienen proteínas de capa S en una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml (Mobili, 2008) y que esta tiene un efecto inhibitorio sobre SE 101 (Golowczyc *et al.*, 2007). En este trabajo, se aislaron las proteínas de superficie de lactobacilos con y sin capa S por la técnica de extracción con LiCl 5M y posterior diálisis descrita por Golowczyc *et al.* (2007). La presencia de las mismas se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, como se muestra en la Figura 3.11.



Para las cepas *Lb kefir* se observa una banda gruesa que corresponde a las proteínas de capa S con un tamaño entre 66 y 70 KDa. La cepa *Lb kefir* 83113 presentó un perfil de proteínas similar a *Lb kefir* 5818 mientras que la extracción de proteínas de superficie de la cepa *Lb kefir* 8321 fue similar a la cepa 8344. Las cepas *Lb plantarum* 83114 y 8327 no poseen estas estructuras, aunque se pueden observar numerosas bandas en el gel que corresponden a proteínas de superficie de diversos tamaños.

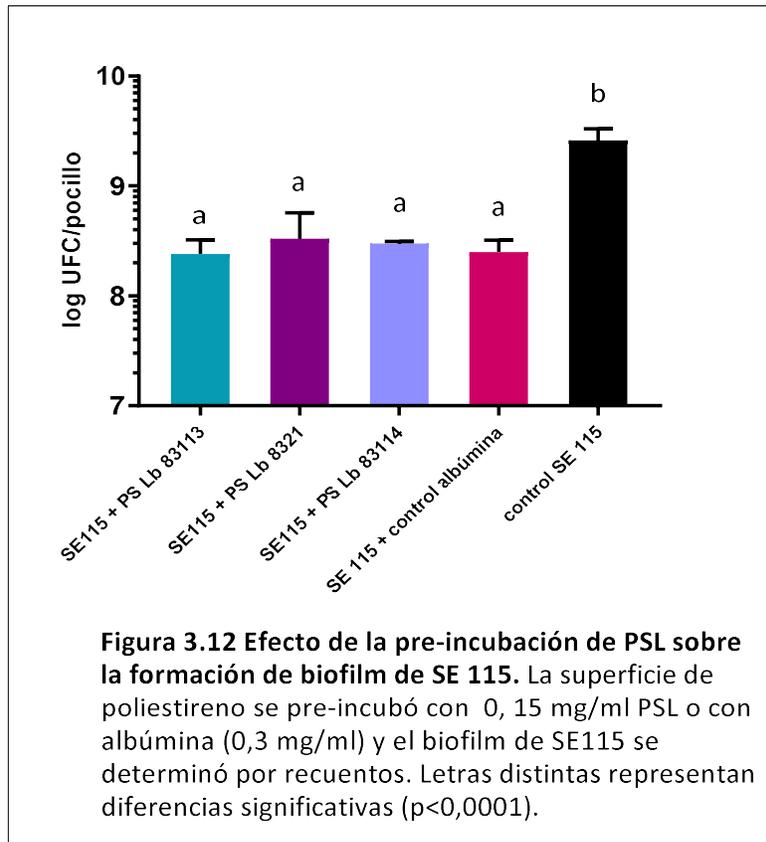
Se evaluó el efecto sobre la cepa de SE 115 de las suspensiones de proteínas de superficie de los lactobacilos. Para los ensayos se utilizaron las cepas *Lb kefir* 83113 y 8321 cuyas proteínas de superficie que se encuentran en mayor cantidad corresponden a la capa S como se observa en la Figura 3.11 y la cepa *Lb plantarum* 83114 que no posee estas proteínas. Como control del experimento se utilizó albúmina sérica, una proteína globular de 66 KDa aproximadamente utilizada habitualmente en numerosas aplicaciones bioquímicas debido a su estabilidad y a que no interfiere en las reacciones biológicas.

### **3.2 Pre-incubación de las proteínas superficiales de lactobacilos**

Las proteínas de superficie de lactobacilos están en contacto directo con el medioambiente y han sido consideradas cruciales en la interacción con superficies (Kotiranta *et al.*, 1998; Schneitz *et al.*, 1993; Sakakibara *et al.*, 2007). Las subunidades de proteínas de capa S son típicamente ricas en aminoácidos ácidos e hidrófobos (Malamud *et al.*, 2016) y se han descrito como responsables de la hidrofobicidad superficial de lactobacilos y del aumento de la adhesión a hexadecano mediante interacciones hidrofóbicas (van der Mei *et al.*, 2003). Sin embargo, no son las únicas proteínas de superficie que se extraen, aunque están en proporción mayoritaria en las cepas de *Lb kefir*.

Para determinar el efecto de las proteínas de superficie sobre la inhibición de la formación de biofilm de *Salmonella*, se pre-incubaron durante 2 horas en la placa de poliestireno, antes de la inoculación de SE 115 y la formación de biofilm se evaluó mediante recuento de viables. Además, se realizó un control pre-incubando la

superficie con la proteína albúmina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.12.



Todas las proteínas extraídas de la superficie de lactobacilos disminuyeron la formación de biofilm de SE 115 mostrando diferencias significativas respecto del control de *Salmonella* ( $p < 0,0001$ ). También se observó inhibición en la pre-incubación con proteína albúmina. Si bien los recuentos de *Salmonella* fueron similares a los obtenidos en la pre-incubación con proteínas de superficie de lactobacilos (0,15 mg/ml), la concentración de proteína albúmina fue dos veces mayor (0,3 mg/ml).

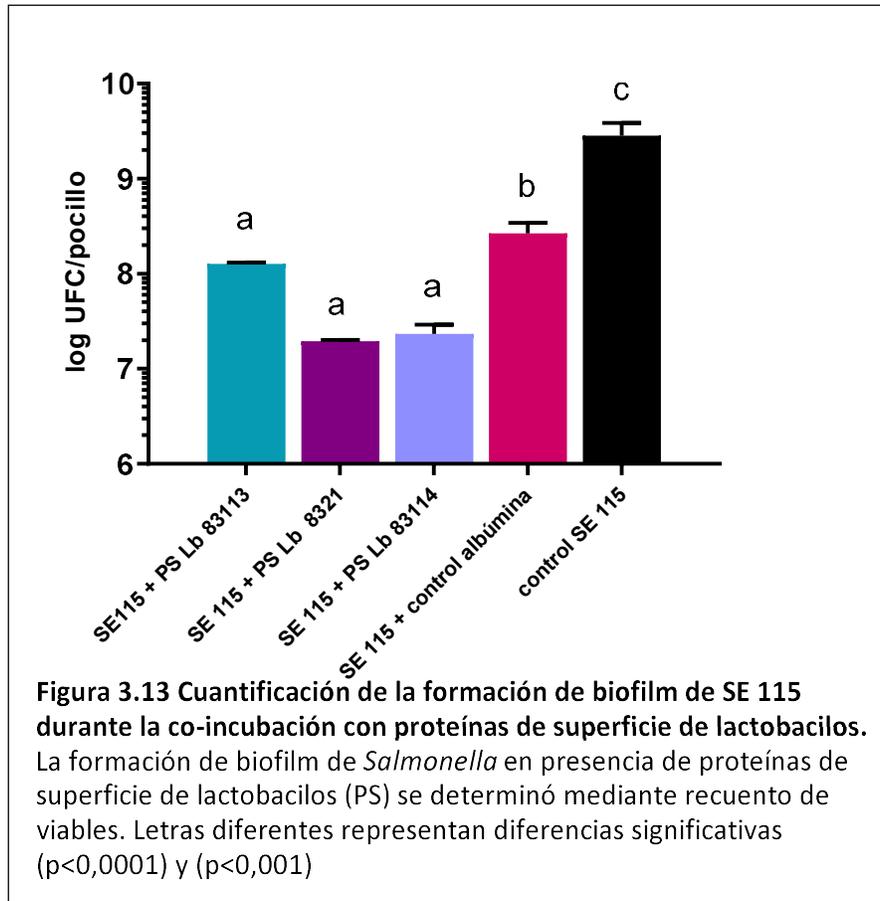
Como se observa en la Figura 3.12, tanto las proteínas de la capa S de *Lb kefir* 8321 como las proteínas de superficie de *Lb plantarum* 83114 que no posee capa S inhibieron la formación de biofilm y no se observaron diferencias significativas entre ellas.

Mediante análisis visual se observó que las proteínas de superficie estaban pegadas al fondo de la placa, bloqueando los sitios de unión de *Salmonella* y, reduciendo más de

una unidad logarítmica los recuentos de *Salmonella* en el biofilm. Esto indica que las proteínas de superficie podrían ser una buena estrategia para modificar la superficie impedir la adhesión y posterior formación de biofilms de microorganismos patógenos. Algunas proteínas pueden disminuir la formación de biofilms bacterianos en el material abiótico, lo que hace que su superficie sea menos hidrófoba; en particular, el efecto anti-adhesivo de la albúmina sérica humana parece estar relacionado con la unión competitiva de esta proteína a una superficie de adhesión (Brokke *et al.*, 1991; Donlan y Costerton, 2002; Kinnari *et al.*, 2005). Sin embargo, para reducir al 90% la formación de biofilm de *E. coli* mediante la pre-incubación de la superficie de poliestireno, la concentración de albúmina necesaria fue de 32 mg/ml según los resultados obtenidos por Naves *et al.* (2010).

### **3.3 Co-incubación de las proteínas superficiales de lactobacilos con *Salmonella***

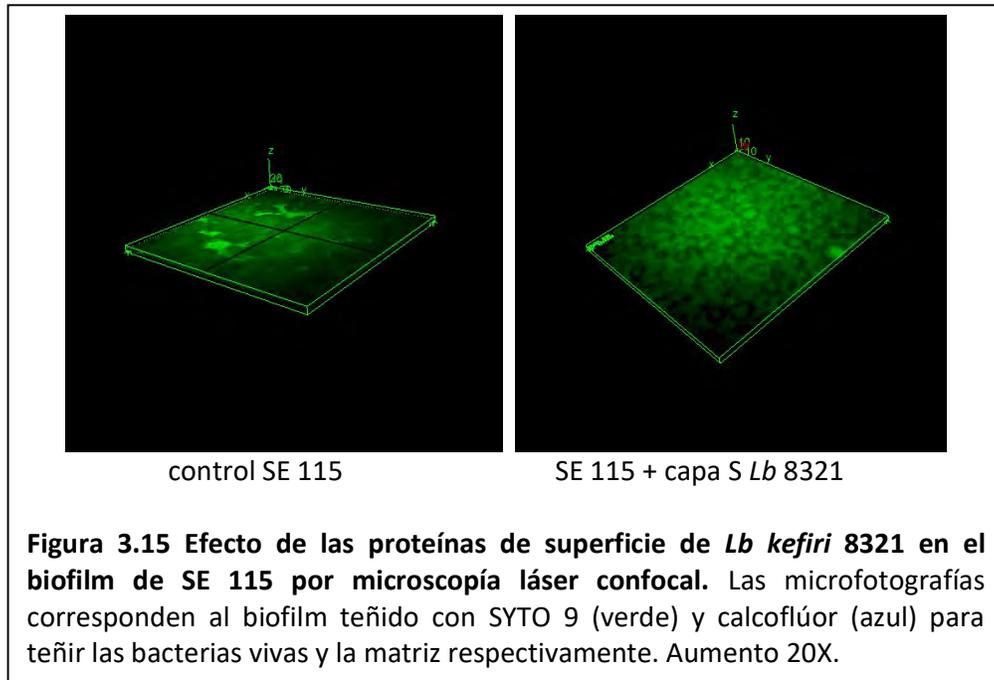
Si bien se conoce que las proteínas de capa S pueden autoensamblarse y unirse a *Salmonella*, no se conoce el efecto inhibitorio sobre la formación de biofilm que pueden tener estas y otras proteínas de superficie de los lactobacilos. Para comprobar que la interacción de *Salmonella* con la capa S y otras proteínas de superficie de lactobacilos pueden afectar la producción de biofilm, se co-incubó SE 115 en presencia de estas proteínas. Como control se utilizó una suspensión de albúmina en igual concentración que en el ensayo anterior, de modo de determinar la especificidad de la interacción entre las proteínas de superficie de lactobacilos y *Salmonella*.



En todos los casos, la co-incubación con proteínas de superficie de lactobacilos inhibió la formación de biofilm de *Salmonella* reduciendo significativamente los recuentos respecto del control, siendo el tratamiento con las proteínas de superficie de lactobacilos las que tuvieron un mayor efecto inhibitorio, reduciendo hasta 2 logaritmos los recuentos de *Salmonella*, en comparación con la proteína albúmina.

En este caso, la inhibición fue mayor que en la pre-incubación de la superficie con las proteínas. Esto puede deberse a que las proteínas podrían interactuar tanto con la superficie del sustrato como con la superficie de las bacterias, impidiendo la adhesión a través de estas dos vías. Otros autores han publicado resultados similares con proteínas de superficie de otros lactobacilos. Petrova *et al.* (2016) informaron que las moléculas aisladas tipo lectina de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG poseen una actividad inhibitoria pronunciada contra la formación de biofilm por varios patógenos, incluidas las especies clínicas de *Salmonella*.

El efecto de las proteínas de superficie de lactobacilos en el biofilm de SE 115 se determinó también mediante microscopía láser confocal. Para ello se incubó *Salmonella* con 0,1 mg/ml de proteínas de superficie de *Lb kefir* 8321 durante 48 hs a 28°C. Como se observó en el gel de la Figura 3.11, las proteínas mayoritarias corresponden a la capa S. Las bacterias se tiñeron con SYTO 9 como se observa en la figura 3.15.

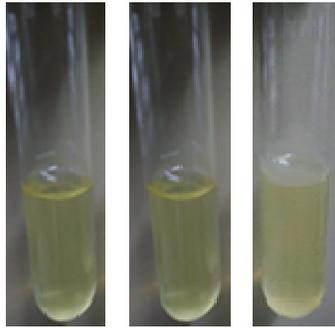


En las microfotografías se observa que la presencia de capa S disminuye el tamaño de clusters de bacterias, en un biofilm más disperso. La incubación con estas proteínas disminuye el tamaño de los culsters de bacterias y afecta el espesor del biofilm. Mientras que el control de SE 115 resultó de 26  $\mu\text{m}$  de espesor, el tratamiento con capa S disminuyó la altura máxima del biofilm a 20  $\mu\text{m}$  indicando que las proteínas de superficie de lactobacilos pueden intervenir en la formación de la estructura del biofilm de *Salmonella*.

#### 4. Fenotipo de SE 115 en presencia de *Lb kefir* 8321

##### 4.1 Formación de película en la interfaz aire-líquido de SE 115 en presencia de *Lb kefir* 8321

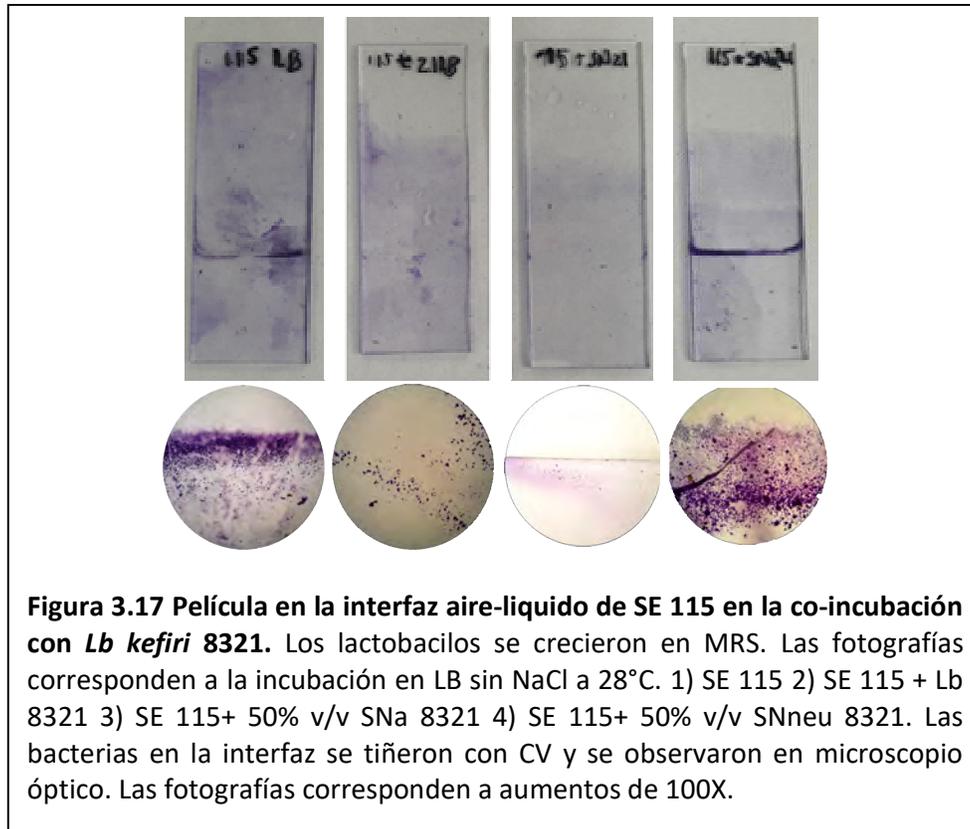
Se determinó el efecto sobre la formación de la película entre las fases del cultivo cuando SE 115 se incubaba en medio LB sin adición de NaCl en presencia de la cepa *Lb kefir* 8321. Para ello, en un tubo de vidrio se resuspendió el pellet de un cultivo del lactobacilo y se inoculó SE 115. Luego de la incubación a 28°C se observó la formación de la película.



**Figura 3.16 Película en la interfaz aire-líquido de SE 115 en presencia de *Lb kefir* 8321 a las 24, 48 y 96 horas.** Las fotografías corresponden a *Salmonella* incubada en medio LB sin NaCl a 28°C en presencia de lactobacilo

En el Capítulo 1 se había encontrado que SE 115 forma una película en la interfaz luego de 24 horas de incubación. La co-incubación con *Lb kefir* 8321 retrasó la aparición de la película a 96 horas de incubación en las mismas condiciones de cultivo.

Este mismo ensayo se estudió en un tubo falcon conteniendo un portaobjetos de vidrio para poder observar la película mediante microscopio óptico. Las fotografías se muestran en la Figura 3.17.



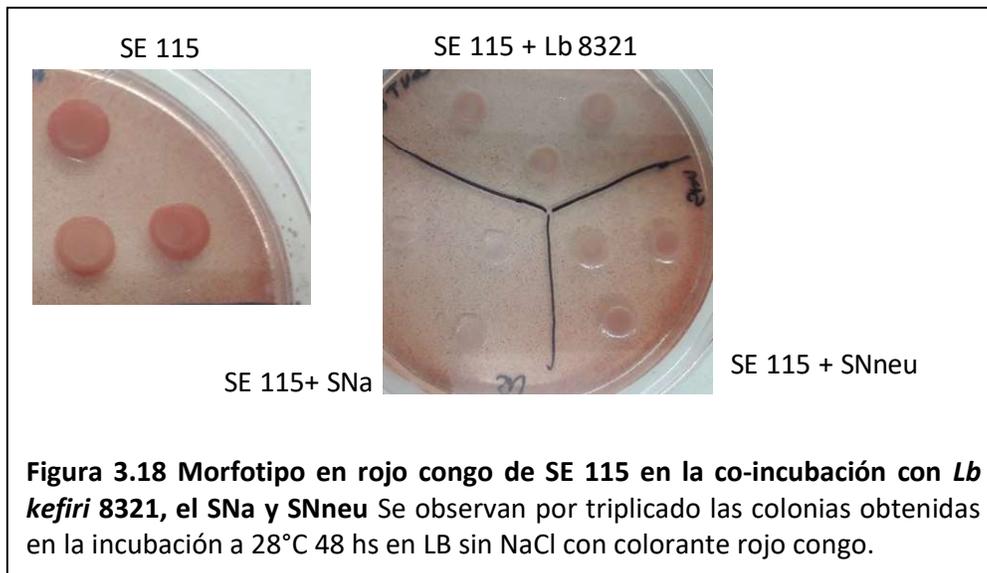
Como se observa en las microfotografías, la cepa SE 115 puede formar una película de bacterias y matriz crecidas sobre el vidrio en la interfaz aire-líquido sobre la superficie del portaobjetos. Cuando se co-incubó con *Lb kefir* 8321, la cepa SE 115 no formó película en la interfaz, indicando que la presencia del lactobacilo inhibe la formación de biofilm de *Salmonella*. El mismo resultado se obtuvo cuando se incubó con el SNa del lactobacilo. Sin embargo, se observó una densa película en la interfaz en presencia de SNneu similar a SE 115. El lactobacilo podría producir una sustancia activa presente en el sobrenadante capaz de inhibir la formación de biofilm de *Salmonella* y dicha sustancia depende del pH.

## 4.2 Estudio de la presencia de *Lb kefir* 8321 en la expresión de curli y celulosa

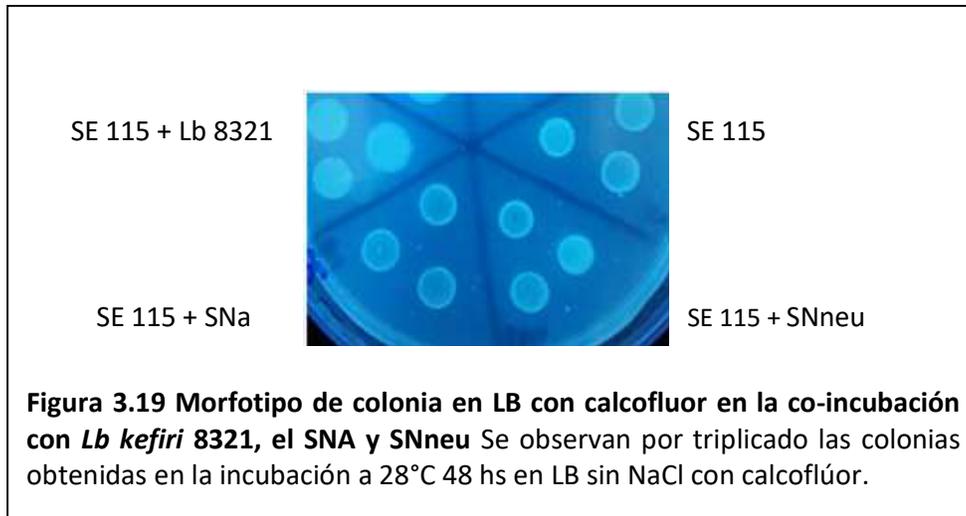
### 4.2.1 Incubación con *Lb. kefir* 8321 viable

Se evaluó el efecto de *Lb kefir* 8321 y sus sobrenadantes de cultivo (SNa y SNneu) en la producción de curli y celulosa de SE 115 mediante el método de morfotipo en rojo congo y calcoflúor. De esta manera, la producción de los componentes de la matriz en presencia del lactobacilo o sus metabolitos se registró fotográficamente cuando el

crecimiento de la macrocolonia se realizó en medio LB sin NaCl con dichos colorantes. En la Figura 3.18 se muestran los resultados obtenidos en rojo congo. Como se vio en el Capítulo 1, la producción de los componentes de la matriz curli y celulosa de *Salmonella* puede observarse mediante el fenotipo de la colonia en rojo congo encontrándose colonias con fenotipo RDAR (produce curli y celulosa), PDAR (produce celulosa pero no curli), BDAR (produce curli pero no celulosa) y SAW (no produce ni curli ni celulosa).



La incubación con SNa da un morfotipo SAW en rojo congo indicando que puede afectar negativamente la producción de curli y celulosa. Esto coincide con los resultados observados para la película en la interfaz aire-líquido en medio LB, donde la presencia de *Lb kefir* inhibe la formación de biofilm. El lactobacilo y el SNneu influyen negativamente en la producción de curli pero no la producción de celulosa ya que en estos tratamientos se observa un fenotipo PDAR. Debido a estos resultados, la formación de la película podría ser un proceso dependiente de la producción de curli pero no de celulosa.



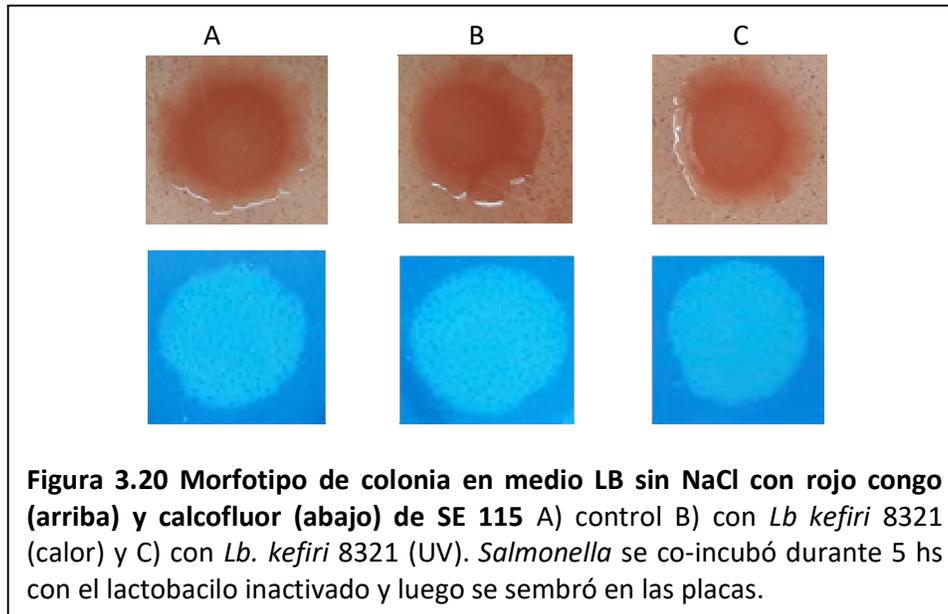
En la Figura 3.19 el morfotipo en calcoflúor indica que la presencia del lactobacilo puede aumentar la producción de celulosa de SE 115 observándose mayor fluorescencia que el control de SE 115. Por otro lado, el sobrenadante no tuvo efecto sobre la producción de celulosa cuando se estudió por calcoflúor.

El papel de la producción de celulosa en las biopelículas de *Salmonella* es controversial. Es ampliamente aceptado que la celulosa es uno de los principales componentes de la matriz extracelular (Zogaj *et al.*, 2001; Solano *et al.*, 2002; Jain y Chen, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que cepas de *S. Agona* y *S. Typhimurium* desarrollan biopelículas en la interfaz aire-líquido, incluso cuando se produce poca cantidad de celulosa (Vestby *et al.*, 2009). Además, se ha descrito una estrategia alternativa de formación de biopelículas dependiente de una sobreproducción de polisacárido capsular que es independiente de la producción de fimbrias curli y celulosa (Malcova *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que la formación de biopelícula de SE 115 se ve afectada en presencia de lactobacilo, independientemente de la cantidad de celulosa producida, pero no de curli. Otra explicación puede ser que la presencia de *Lb kefir* 8321 disminuya el pH cambiando la capacidad de curli de unirse a rojo congo, con lo cual se observaría un fenotipo PDAR.

Dado que la incubación con 8321 aumenta la producción de celulosa e inhibe la producción de curli (fenotipo PDAR) y que no hay formación de biopelícula en la interfaz aire líquido podríamos pensar que el lactobacilo podría influir en la producción de curli.

#### 4.2.2 Incubación con *Lb. kefir* 8321 no viable

Para determinar si el efecto sobre el morfotipo de SE 115 es debido a la capacidad del lactobacilo de crecer y producir sustancias activamente, la evaluación de la producción de curli y celulosa en rojo congo y calcoflúor se estudió mediante la co-incubación de SE 115 en presencia de *Lb. kefir* 8321 inactivada por calor y por UV y se visualizaron las colonias obtenidas como se muestra en la Figura 3.20.



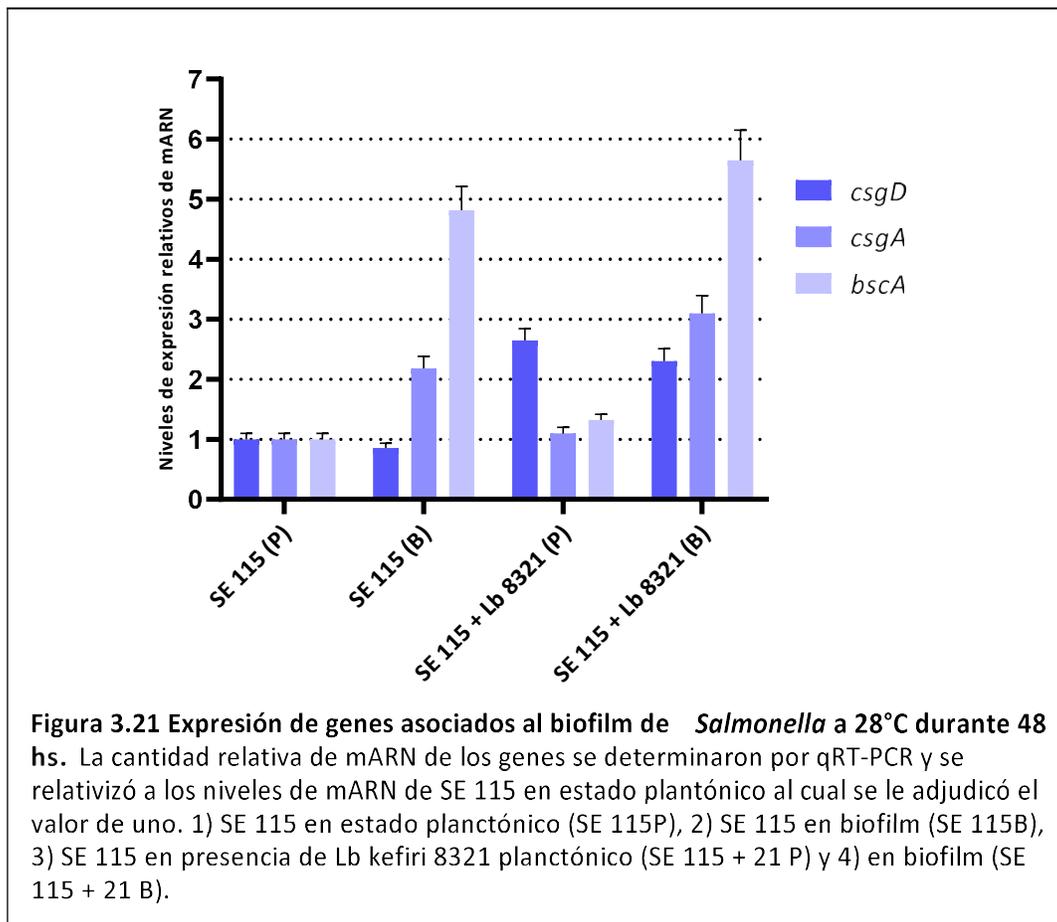
Como se observa en las fotografías, la presencia del lactobacilo inactivado por calor o por UV no produce cambios en el morfotipo de la colonia, ya que la producción de curli y celulosa resultaron similares al control de SE 115 sin lactobacilos. Estos resultados indican que el efecto de *Lb. kefir* 8321 sobre la producción de los componentes de la matriz del biofilm requiere la viabilidad del lactobacilo para la secreción activa de sustancias presentes en el sobrenadante como se observó en el punto anterior. Estudios previos demostraron que exopolisacáridos así como moléculas tipo lectinas producidas por *Lactobacillus* inhiben la formación de biofilms de patógenos (Kim *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015; Malik *et al.*, 2016; Petrova *et al.*, 2016 a, b).

### **5. Efecto de *Lb. kefir* 8321 sobre la expresión de genes asociados a la formación de biofilm de SE 115 mediante qPCR**

Como se describió en la introducción, la formación de biofilm está regulada por una compleja red de genes que se expresan durante su formación. Se conoce que en *Salmonella* está estrictamente regulada por una red que involucra múltiples reguladores transcripcionales siendo *csgD* el principal regulador transcripcional (Steenackers *et al.*, 2012). Como se dijo anteriormente, se han demostrado varios mecanismos por los cuales las bacterias lácticas pueden inhibir el desarrollo de biofilm de *Salmonella* tales como la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos, moléculas tipo lectinas, biosurfactantes y EPS (Petrova *et al.*, 2016; Shokri *et al.*, 2017; Wasfi *et al.*, 2018). Sin embargo, la revisión de la bibliografía demuestra que aún no han sido estudiados los efectos de la co-incubación de lactobacilos con *Salmonella* sobre la expresión de genes asociados a biofilm. Wu *et al.* (2014) estudiaron el efecto de la co-incubación de *Lb salivarius* y *Lb rhamnosus* GG sobre la formación de biofilm de *St mutans* y sobre la expresión de genes responsables de la producción de EPS soluble (*gtfD*) e insoluble (*gtfB* y *gtfC*) ambos componentes de la matriz extracelular del biofilm. Estos investigadores encontraron que los dos lactobacilos inhiben la formación de biofilm de *S mutans*, pero el efecto en los niveles de mRNA fueron diferentes. Mientras que *Lb salivarius* disminuyó la expresión de estos tres genes, *Lb rhamnosus* GG aumentó la expresión de *gtfB* y *gtfC* y no modificó los niveles de expresión de *gtfD*. Además, la incubación de *St mutans* con *Lb rhamnosus* GG tratada con calor (80°C 20 minutos) logró inhibir la formación del biofilm por unión a la superficie de contacto, pero no causó efecto en la expresión de estos genes. Los autores no proponen una explicación para estos resultados. Sin embargo, es posible que en un biofilm multiespecie, las bacterias influyan en los perfiles de expresión génica mutuos a través de mecanismos complicados, como las respuestas de tolerancia ácida, de producción de polisacáridos y el *quorum sensing* (Kuramitsu *et al.*, 2007; Redanz *et al.*, 2011 Wasfi *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se estudió la expresión de tres genes relevantes asociados a la formación de biofilm en *Salmonella* en presencia de la cepa *Lb. kefir* 8321 cuantificado mediante transcripción reversa y qPCR (qRT-PCR). El principal regulador en la formación de biofilms, el gen de la subunidad D de curli

(*csgD*), funciona activando la biosíntesis de la matriz polimérica extracelular compuesta de exopolisacárido celulosa, curli y proteínas asociadas a la biopelícula (Baps), que asisten a las bacterias en la transición de la etapa planctónica al estado multicelular (Liu *et al.*, 2014). El gen *csgA*, que participa en la síntesis de la subunidad A de las fimbrias tipo curli y el gen *bcsA*, síntesis de la enzima celulosa sintetasa (Aya-Castañeda *et al.*, 2015). Se estudió la expresión de estos genes por qRT-PCR y las cantidades de mRNA obtenidas se normalizaron con el gen de expresión constitutiva (*housekeeping*) *gyrB*, gen que codifica para la subunidad B de la ADN girasa. Para ver que la expresión de genes es exclusiva de la formación de biofilm, como control de expresión se utilizó la SE 115 en estado planctónico.



Como se observa en la Figura 3.21, en las células de *Salmonella* en el biofilm (SE 115 B) los genes asociados a la producción de los componentes de la matriz del biofilm se

encuentran aumentados dos (*csgA*) y casi cinco (*bcsA*) veces respecto del estado planctónico (SE 115 P) indicando que estos componentes se están expresando activamente tal como se había observado previamente con calcoflúor (Figura 3.19). Sin embargo, *csgD* presenta los mismos niveles de expresión que el control en estado planctónico. Esto puede indicar que a las 48 hs de incubación se obtiene un biofilm de *Salmonella* maduro con el gen *csgD* “apagado”. Grantcharova *et al.* (2010) demostró que esto puede corresponder a una expresión de *csgD* biestable. La formación de biofilm se considera un proceso energéticamente costoso para las células, por ejemplo, por la producción de los componentes de la matriz y la expresión de *csgD* está dada sólo por una subpoblación de bacterias que luego es compartida con el resto, minimizando el costo y maximizando los beneficios de toda la población en el biofilm, lo que se considera una expresión biestable (Branda *et al.*, 2006). Se pueden distinguir así dos subpoblaciones de células en función de su contenido de CsgD: una población de alta expresión (CsgD-ON) y una de baja expresión (CsgD-OFF). En consecuencia, la expresión bimodal de *csgD* conduce al establecimiento de la diversidad fenotípica durante el desarrollo del biofilm. En *Salmonella* la inactivación de la expresión de *csgD* (como se observa en el gráfico 3.20) no disminuye la cantidad de mRNA del operon *csgDEFG* (Römling *et al.*, 2000). Esta expresión biestable de CsgD permite a *Salmonella* adaptarse fácilmente a las condiciones ambientales cambiantes, como una situación de estrés o en un entorno hostil.

Estudios realizados en otras especies bacterianas han proporcionado información sobre varios mecanismos que conducen a la inhibición competitiva de la maduración de biofilms a nivel transcripcional. Por ejemplo, la arginina desaminasa de superficie de *Streptococcus crispatus* disminuye la expresión de *fimA*, que codifica la subunidad principal de las fimbrias de *Porphyromonas gingivalis* que es necesaria para la unión irreversible y el desarrollo de biofilms (Xie *et al.*, 2000, 2007). Otro estudio informó que un homólogo ArcA de *St intermedium* también inhibió la formación de biofilms regulando negativamente la expresión de fimbrias cortas (*mfa1*) y largas (*fimA*) (Christopher *et al.*, 2010).

Recientemente se informó que los EPS de matriz, además de ser componentes esenciales de la mayoría de los biofilms, protegen a las bacterias de la desecación y actúan como moléculas de señalización que inducen cambios en la expresión génica de

las bacterias circundantes. La formación de biofilms de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), por ejemplo, disminuyen en presencia de EPS aislados de *Lb acidophilus*. Si bien el crecimiento de EHEC y *quorum sensing* no se vieron afectados, la transcripción de genes para curli (*crl*, *csgA* y *csgB*) y de quimiotaxis (*cheY*) se redujo significativamente (Kim *et al.*, 2009). También se reportado la capacidad de EPS de *Lb acidophilus* para inhibir el biofilm *S enteritidis*, *S Typhimurium*, *Y enterocolitica*, *P aeruginosa* y *L monocytogenes* (Kim *et al.*, 2009).

Nuestros resultados demuestran que la expresión de genes en el biofilm de *Salmonella* se ve claramente afectada en presencia del lactobacilo, siendo *csgD* dos veces mayor cuando SE 115 se incubaba con *Lb kefir* 8321 tanto en planctónico como en biofilm, lo que podría indicar un entorno menos favorable por la presencia del lactobacilo. Además, las células de SE 115 del biofilm aumentan tres veces la expresión relativa de los genes asociados a la producción de curli (*csgA*) y casi seis veces los genes asociados a la producción de celulosa (*bscA*) respecto al estado basal, y esto puede deberse a que la presencia del lactobacilo resulta en una situación de estrés para *Salmonella*. Estos resultados indicarían que el lactobacilo podría retrasar la formación de biofilm de *Salmonella*. La variación fenotípica se encuentra con frecuencia en los sistemas naturales de bacterias y abarca desde la utilización de nutrientes a través de la competencia hasta la expresión de genes de virulencia (Simm *et al.*, 2009). Estos resultados indicarían que en presencia del lactobacilo hay mayor producción de componentes de la matriz a expensas de un número menor de bacterias de SE 115 como se observó en los ensayos previos de recuentos de viables (Figura 3.3).

Nuestra revisión bibliográfica indica que, si bien se ha estudiado la influencia de sobrenadantes de bacterias lácticas o metabolitos aislados de ellas en la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella*, existen pocos trabajos publicados que estudien o encuentren una interferencia de los lactobacilos en la expresión de genes de *Salmonella* vinculados a la formación de biofilm. Por esta razón, los resultados obtenidos pueden ser importantes para entender los mecanismos de inhibición de biofilm por lactobacilos.

## Conclusiones

- Tres lactobacilos *Lb kefir* 83113 y 8321 y *Lb plantarum* 83114 inhibieron significativamente la formación de biofilm de *Salmonella* tanto en ensayos de co-incubación como de pre-incubación.
- Los sobrenadantes de lactobacilos presentan una sustancia bioactiva a pH ácido capaces de inhibir la formación de biofilm de *Salmonella* en mayor medida que a pH neutralizado.
- Las proteínas de superficie extraídas de los lactobacilos estudiados lograron disminuir significativamente la producción de biofilm de SE 115 a una concentración de 0,1 mg/ml de proteína. Este efecto se observó tanto en la pre-incubación como en la co-incubación. La co-incubación con las proteínas de superficie de la cepa *Lb kefir* 8321 fue la que presentó mayor inhibición del biofilm.
- EL desarrollo en conjunto de *Lb kefir* 8321 inhibió la formación de biopelícula de SE 115 en la interfaz aire-líquido a las 48 horas, la cual apareció a las 96 horas de incubación. Esto indica un retraso en la formación de biofilm de *Salmonella* por acción del lactobacilo.
- La incubación con *Lb kefir* 8321 viable y del sobrenadante del lactobacilo cambió el morfotipo de la colonia de RDAR a PDAR o SAW. Dicho cambio se encuentra asociado a una menor formación de curli.
- La expresión de genes *csgD*, *csgA* y *bscA* en *Salmonella* indican que a las 48 horas de incubación se tiene una expresión aumentada de los genes relacionados a la producción de curli y celulosa pero no afectó la expresión del gen *csgD*. La incubación con *Lb kefir* 8321 luego de 48 horas aumentó dos veces la expresión de *csgD*, tres veces la expresión de *csgA* y casi seis veces la expresión de *bscA*

## CAPÍTULO IV

---

LACTOBACILOS Y SUS METABOLITOS  
SOBRA LA CAPACIDAD FORMADORA  
DE BIOFILM DE *SALMONELLA*  
EN CÁSCARA DE HUEVO

# CAPÍTULO 4

## Lactobacilos y sus metabolitos sobre la capacidad formadora de biofilm de *Salmonella* en cáscara de huevo

La infección por *Salmonella* en humanos constituye una de las principales causas de morbilidad en el país, siendo uno de los patógenos más frecuentemente aislados en infecciones de transmisión alimentaria (Caffer y Pichel, 2006; agencia Gubernamental de Control, 2011). Se transmite a humanos en gran medida por el consumo de huevos cuya superficie externa se encuentra contaminada principalmente por excrementos de las aves y otros residuos provenientes de la industria (Mead *et al.*, 1999). En este sentido, la *Salmonella* adherida a la cáscara puede ingresar al huevo contaminando el interior del mismo. Es una preocupación importante de salud pública en todo el mundo, que representa 93.8 millones en enfermedades transmitidas por alimentos y 155,000 muertes por año (Eng *et al.*, 2015). Durante la última década, el número de casos de salmonelosis transmitidos por alimentos relacionados con el huevo o sus productos ha aumentado sustancialmente (OzFoodNet Working Group, 2012). Por lo tanto, la desinfección efectiva de la superficie es crítica para reducir estos patógenos en los huevos y controlar brotes de enfermedades relacionados a estos alimentos. Aunque los antimicrobianos se utilizan con frecuencia para prevenir o tratar las infecciones por *Salmonella*, la eficacia y certeza para su utilización todavía se encuentra en debate (Gast, 2013). La aplicación de desinfectantes disminuye el riesgo a la exposición a diferentes patógenos, aunque su uso masivo ha sido relacionado con el desarrollo de resistencia a antimicrobianos, particularmente co-resistencia o resistencia cruzada a antibióticos de importancia clínica (Chapman, 2003; Russel, 2004; Long *et al.*, 2016). Se ha demostrado que el uso de glutaraldehído, formaldehído y peróxido de hidrógeno son inadecuados para la eliminación de *Salmonella* independientemente del serotipo y del tiempo de contacto con el desinfectante (Marín *et al.*, 2009).

Como se ha visto en los capítulos previos, *Salmonella* puede formar biofilms sobre distintas superficies que suelen encontrarse normalmente en la industria alimentaria. Esto le permite permanecer viable en el ambiente, lo que puede resultar en la contaminación cruzada de una variedad de productos alimenticios. El impacto asociado con la formación de biopelículas patógenas y su transmisión a los alimentos enfatizan la importancia de comprender la formación de biofilms de *Salmonella* en cáscara de huevo. En este capítulo se determinó la capacidad de *Salmonella* de formar biofilm sobre la superficie de la cáscara de huevo y se evaluó el efecto de los lactobacilos y sus metabolitos sobre dicha formación.

## Objetivos

- Estudiar la formación de biofilm de *Salmonella* sobre la superficie de la cáscara de huevo.
- Determinar el efecto de la incubación de lactobacilos con *Salmonella* en el desarrollo del biofilm.
- Evaluar el impacto de proteínas de superficie y de los metabolitos presentes en el sobrenadante de cultivos de lactobacilos en la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* sobre la cáscara de huevo.



# Resultados y discusión

## 1. Formación de biofilm de *Salmonella* sobre la superficie de la cáscara de huevo

El huevo posee una protección natural contra la penetración bacteriana ya que las proteínas tales como albúmina y lecitina poseen propiedades antibacterianas (Mahmood, 2015; Baron *et al.*, 2016). Sin embargo, después de la oviposición, el huevo está expuesto a una variedad de áreas contaminadas dependiendo de la presencia de materia orgánica húmeda, incluyendo las excretas, que actúan como una barrera de protección y aporte de nutrientes para la sobrevivencia y desarrollo de *Salmonella* sobre la cáscara. Además, el huevo queda expuesto a una temperatura corporal menor que la del ave, creando de ese modo una presión negativa, lo que permitiría a las bacterias penetrar más fácilmente tanto la cáscara como las membranas, primero a través de los poros que carecen de la protección de la cutícula. A medida que la cutícula se seca y se contrae, los poros quedan más expuestos al pasaje de las bacterias (Howard *et al.*, 2012).

Aunque existen varias investigaciones sobre la formación de biofilms en *Salmonella* (Solano *et al.*, 2002; Vestby *et al.*, 2009), se han realizado pocos estudios sobre el comportamiento de este patógeno en contextos de producción avícola y, particularmente, hay pocos estudios sobre la incidencia de cepas de *Salmonella* formadoras de biopelículas aisladas de estos ambientes (Schonewille *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013, Pande *et al.*, 2016). Ha sido determinado previamente que *Salmonella* es capaz de formar biofilm sobre distintas superficies abióticas (Steenackers *et al.*, 2012) y sobre la superficie de huevo de codorniz (Pande *et al.*, 2016). Sin embargo, existe poca información sobre esta situación que puede ocurrir en establecimientos de producción de alimentos donde constituye una fuente de contaminación cruzada y, por otro lado, es necesario estudiar el impacto de las cepas de *Salmonella* aisladas en granjas avícolas de nuestra región.

### 1.1 Por recuento en placa

En este trabajo, se determinó la capacidad de la cepa SE 115 aislada de guano de una granja avícola de Entre Ríos, de formar biofilm sobre la superficie de huevos de gallina.

Para ello se desinfectó la superficie de la cáscara como se detalló en materiales y métodos y luego se inoculó con el cultivo de *Salmonella*. Luego de 48 horas de incubación a 28°C y posterior lavado con PBS, las bacterias en biofilm fueron desprendidas mecánicamente y enumeradas por recuento en placa. Los resultados obtenidos indicaron que la cepa de *Salmonella* estudiada presenta capacidad de formación de biofilm sobre cáscara de huevo, obteniéndose un recuento de  $7,8 \pm 4,5 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>. Tal como se determinó previamente, los recuentos obtenidos para esta cepa en poliestireno en las mismas condiciones de cultivo habían sido de  $1 \times 10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>. Dado que la cepa SE 115 había resultado hidrofóbica, esta diferencia puede deberse a una mayor afinidad de la superficie bacteriana al material de poliestireno.

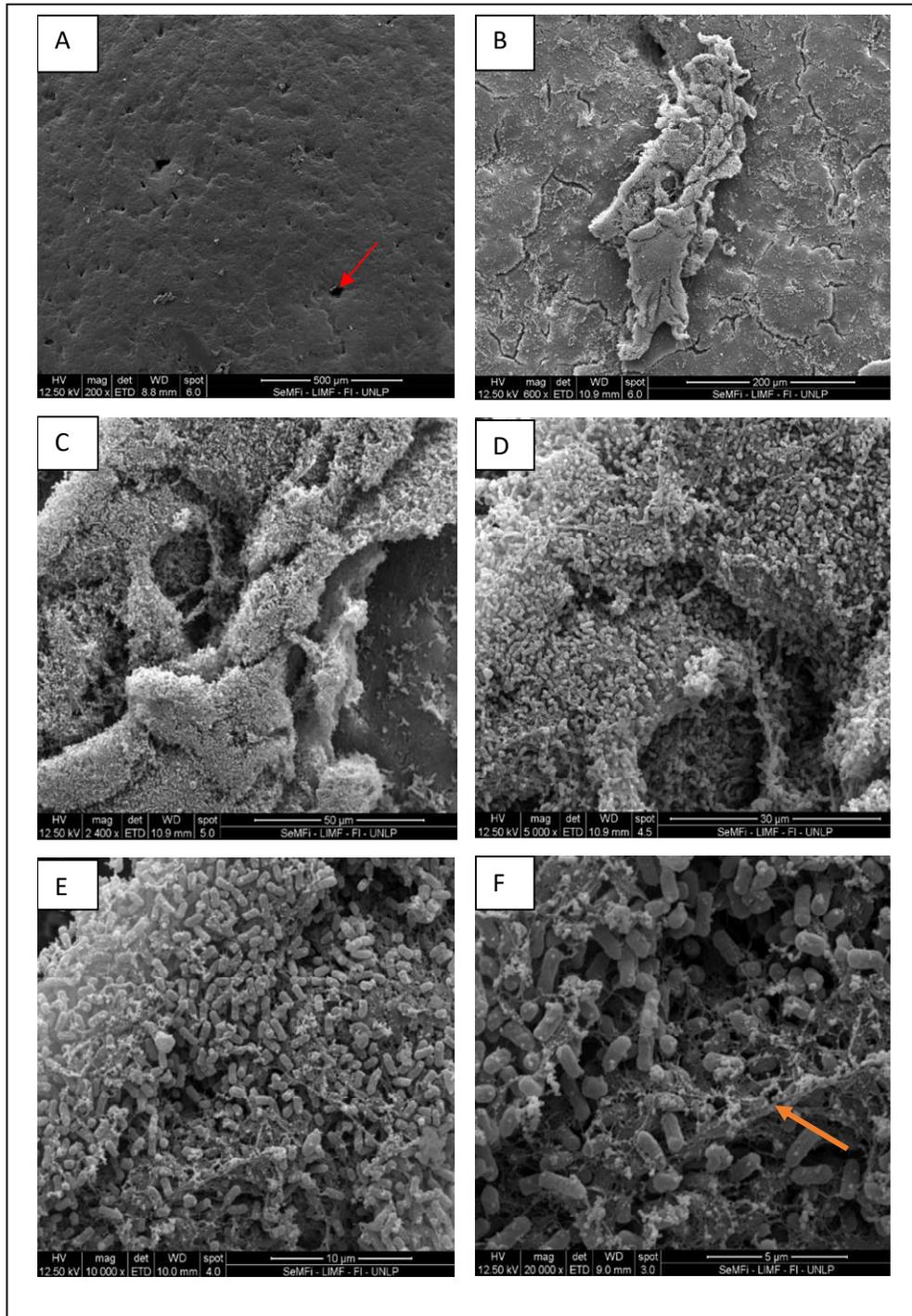
La cáscara de huevo está compuesta principalmente por carbonato de calcio. Durante la mineralización del huevo, los componentes orgánicos del líquido uterino promueven la formación de calcita, (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2008) y cuando se completa una fina capa de cutícula no calcificada recubre la cáscara (Chien *et al.*, 2009). Los poros que atraviesan la cáscara del huevo permiten la difusión de gases y vapor de agua (Hincke *et al.*, 2012). El material cuticular que se extiende por la abertura de los poros se compone principalmente de proteínas (glucoproteínas) (90%) y, en menor proporción, polisacáridos y lípidos (Hasiak *et al.*, 1970; Wedral *et al.*, 1974; Rose-Martel *et al.*, 2012; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2013). Algunas de las proteínas de la cutícula (lisozima C, ovotransferrina, ovocalyxina y ovocleidina) y los componentes lipídicos han demostrado tener actividad antimicrobiana y podría contribuir significativamente a la seguridad del huevo, especialmente teniendo en cuenta que es la primera barrera que encuentran los microorganismos (Wellman-Labadie *et al.*, 2008, 2010; Jonchere *et al.*, 2010; Rose-Martel *et al.*, 2012). Sin embargo, Muñoz *et al.* (2015) han observado que *Salmonella* puede penetrar y sobrevivir en el huevo y que la capacidad de limitar el crecimiento bacteriano disminuye con la edad del animal.

En un estudio realizado por Pande *et al.* (2016) encontraron que diferentes serovariedades de *Salmonella entérica* aisladas de granjas avícolas pudieron formar biofilm sobre cáscara de huevo de codorniz en medio LB a 22°C donde obtuvieron recuentos similares, resultando en promedio  $1,0 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> dependiendo de la serovariedad estudiada.

En el estudio de biofilms, los enfoques biológicos incluyen tinción semi-cuantitativa, mediciones de biomasa seca, cuantificación de proteínas o ADN, o evaluaciones de organismos viables residuales a través de técnicas estándar de cultivo microbiano (Hadi *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2013). Cada método tiene ventajas y deficiencias, pero todos proporcionan solo valores indirectos y son propensos a la variabilidad inducida por el operador (Vyas *et al.*, 2016). En contraste, la imagen directa del biofilm proporciona información sobre sus características estructurales, su interacción con la superficie, así como información espacial sobre la homogeneidad de los biofilms. Por este motivo, resulta interesante estudiar la formación de biofilm por microscopía.

### **1.2 Por microscopía electrónica de barrido**

En este ensayo, la técnica de SEM (*scanning electronic microscopy*, por sus siglas en inglés) se utilizó para la evaluación de la formación de biofilm de SE 115 sobre la superficie de la cáscara de huevo después de la incubación durante 48 hs a 28°C. Estas imágenes revelaron que la cepa SE 115 se adhiere firmemente a la superficie formando biofilms en densas capas superpuestas, como se muestra en la Figura 4.1.



**Figura 4.1 Microscopía electrónica de barrido del biofilm formado por SE 115 sobre cáscara de huevo.** A) cáscara de huevo 200X, la flecha roja señala el poro en la cáscara. B)-F) SE 115 a diferentes aumentos. Se observan las bacterias adheridas a la superficie de la cáscara embebidas en la matriz polimérica extracelular. La flecha naranja señala la matriz extracelular.

Este estudio reveló que las bacterias estaban presentes en la superficie de la cáscara del huevo formando densos clusters de células embebidas en una matriz extracelular después de la incubación durante 48 horas. La producción de esta matriz extracelular característica indica que en 48 hs de incubación se había formado un biofilm maduro. La matriz extracelular observada en la Figura 4.1, fue similar a la reportada anteriormente por Crawford *et al.* (2008). En dicho trabajo estudiaron la formación de biofilm de *Salmonella* sobre cálculos biliares por microscopía electrónica y la estructura de la matriz extracelular se observa como un material floculante y fibroso que se pega a las bacterias. Se ha informado que *Salmonella spp.* puede sobrevivir en la superficie de la cáscara de huevo hasta 3 a 4 semanas luego de su establecimiento (Gole *et al.*, 2014a; Gole *et al.*, 2014b; Lublin *et al.*, 2015).

Las heces de aves de corral pueden servir como fuente de nutrientes, contribuyendo así a la multiplicación *Salmonella* sobre cáscara de huevo (Messens *et al.*, 2007). Por otro lado, algunas serovariedades de *Salmonella* como Typhimurium, Agona e Infantis pueden formar biofilms en esta superficie. En el estudio realizado por Pande *et al.* (2016) en el desarrollo de biofilms de diferentes serovariedades de *Salmonella* mediante SEM se observaron estructuras similares a las de la Figura 4.1. Las imágenes mostraron una capa densa de células estrechamente unidas y encapsuladas dentro de la matriz extracelular. Dado que las bacterias mostraron un morfotipo RDAR en placas de agar rojo Congo a 28°C, los investigadores proponen la presencia de curli y celulosa en dicha matriz.

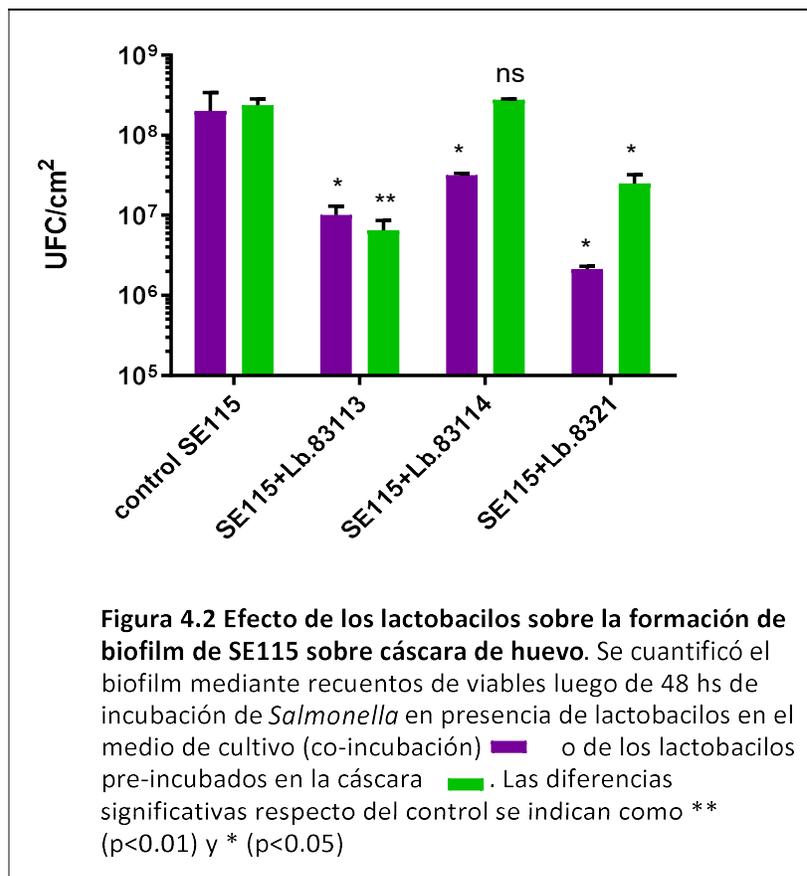
Las cáscaras de huevo presentan numerosos poros que son lo suficientemente grandes como para actuar como puertas de entrada para microorganismos (Cardoso *et al.*, 2001; Silva, 2005). Los poros de la cáscara tienen un tamaño aproximado de 4 µm y permiten la entrada de *Salmonella* al huevo alcanzando tanto la albúmina como la yema (Fonseca *et al.*, 2019). La formación de biofilm de *Salmonella* sobre la cáscara presenta así una posible fuente de contaminación de huevos.

## **2. Estudio de los lactobacilos y sus metabolitos sobre el biofilm de SE 115 en cáscara de huevo**

En este trabajo se estudió el uso de *Lb kefir* 8321 y *Lb kefir* 83113 y *Lb plantarum* 83114 como estrategia para el control de la formación de biofilm de *S. Enteritidis* 115 sobre la superficie de la cáscara de huevo.

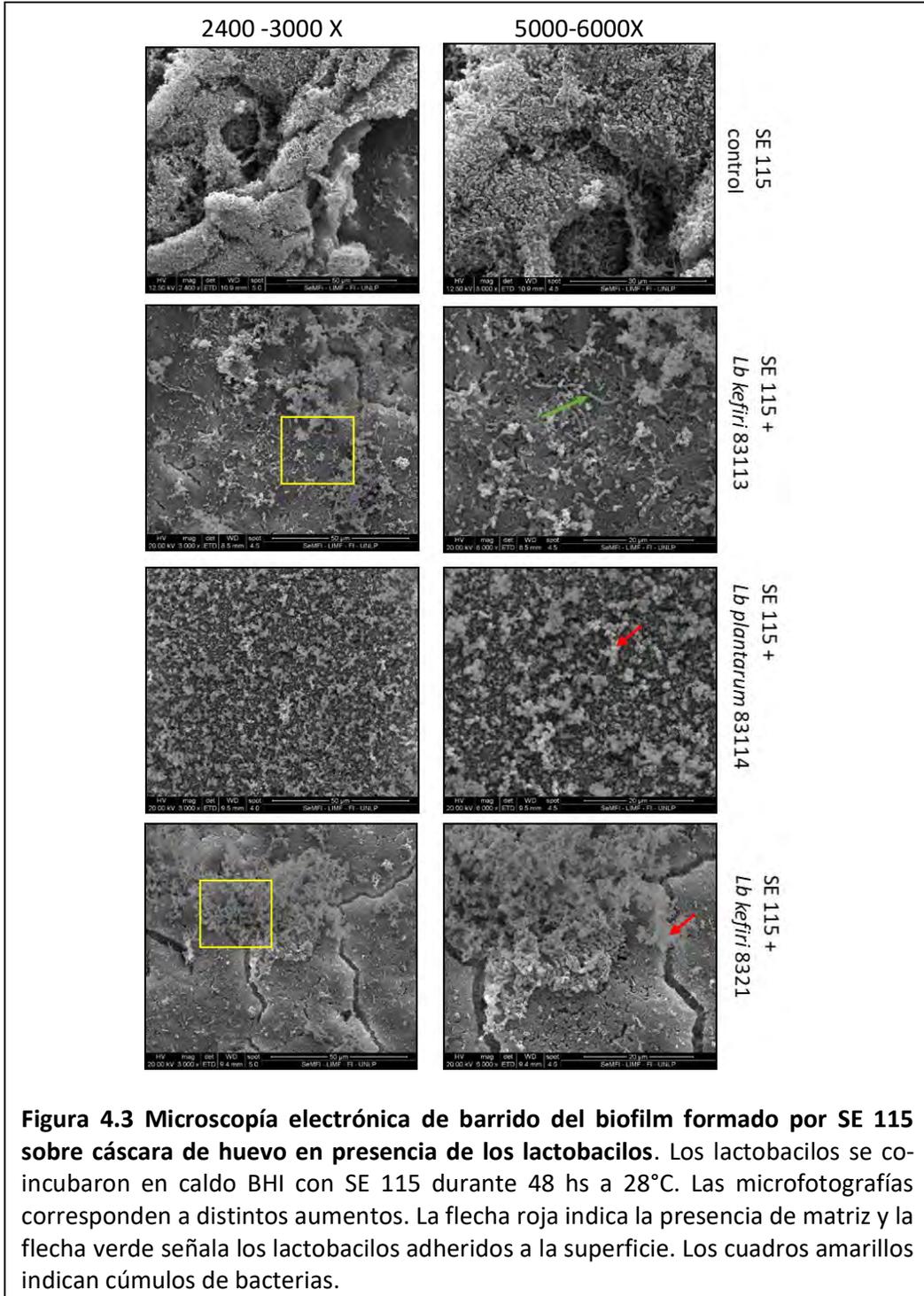
### 2.1 Efecto de lactobacilos

Se estudió el efecto de la incubación de tres lactobacilos, *Lb kefir* 8321 y *Lb kefir* 83113 y *Lb plantarum* 83114, sobre el desarrollo en biofilm de SE 115. Las cepas de lactobacilos fueron seleccionadas por su capacidad co-agregante y de inhibir la formación de biofilm de *Salmonella* SE 115, según se mostró en el capítulo 3. Sobre esta base se decidió evaluar dicha interacción sobre la superficie de cáscara de huevo. Para ello, se realizaron recuentos de *Salmonella* en el biofilm resultante de la co-incubación con los tres lactobacilos seleccionados y de la pre-incubación de estos sobre una superficie de 1 cm<sup>2</sup> de cáscara de huevo que había sido previamente esterilizada. En la Figura 4.2 se muestran los recuentos de *Salmonella* luego de estos tratamientos.



La co-incubación de SE 115 con las tres cepas de lactobacilos redujo la formación de biofilm de *Salmonella* ya que los recuentos resultaron significativamente menores que control (p<0.05). Similares resultados se obtuvieron cuando *Lb kefir* 83113 (p<0.01) y 8321 (p<0.05) fueron pre-incubados sobre la cascara previo a la inoculación con SE 115.

Sin embargo, la pre-incubación con *Lb plantarum* 83114 no modificó la formación de biofilm de *Salmonella* sobre la cáscara de huevo evaluada por recuento de células viables. También se determinó la formación de biofilm de SE 115 co-incubada con las tres cepas de lactobacilos seleccionados y se visualizó el biofilm mediante SEM (Figura 4.3).



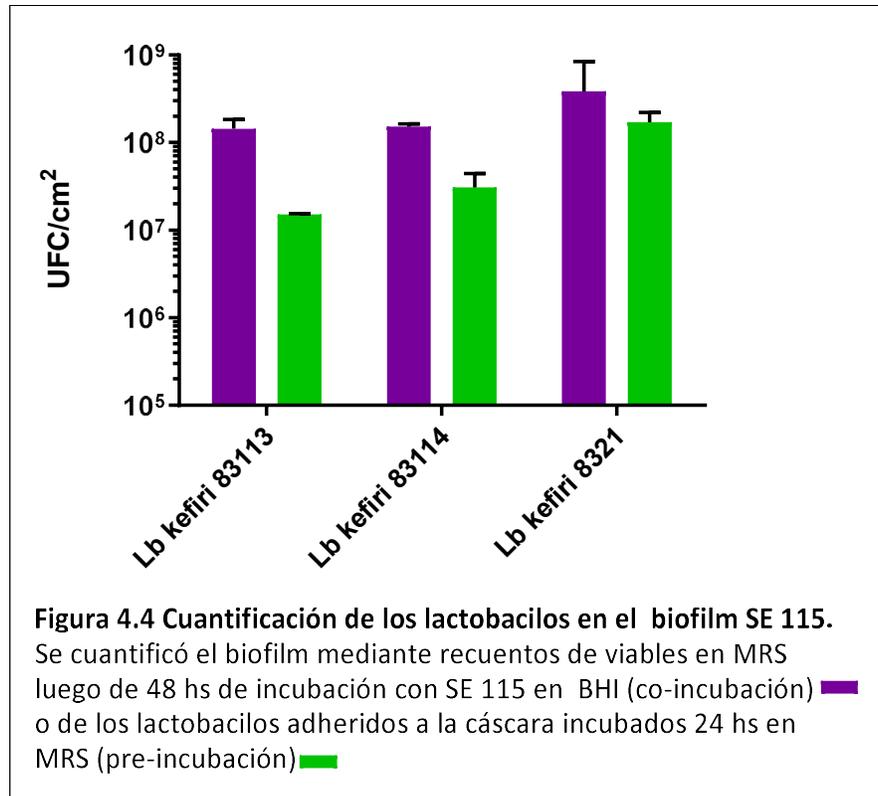
**Figura 4.3** Microscopía electrónica de barrido del biofilm formado por SE 115 sobre cáscara de huevo en presencia de los lactobacilos. Los lactobacilos se co-incubaron en caldo BHI con SE 115 durante 48 hs a 28°C. Las microfotografías corresponden a distintos aumentos. La flecha roja indica la presencia de matriz y la flecha verde señala los lactobacilos adheridos a la superficie. Los cuadros amarillos indican cúmulos de bacterias.

En los tres casos, la co-incubación con los lactobacilos resultó en la disrupción de la estructura del biofilm desarrollado por SE 115. Se puede observar una menor cantidad de bacterias y cúmulos más chicos distribuidos en forma dispersa sobre la superficie. Este resultado está en concordancia con la disminución de los recuentos de viables de SE 115 como se había observado en la Figura 4.2.

El tratamiento con las distintas cepas de lactobacilos tuvo efectos diferentes sobre el biofilm de *Salmonella*. En el biofilm desarrollado luego de la co-incubación con *Lb kefir* 83113 se pudieron observar microcolonias embebidas en matriz extracelular, pero en algunas zonas se observaron lactobacilos adheridos a la superficie de la cáscara, alrededor de los cuales no se observó desarrollo de biofilm. Cuando SE 115 se co-incubó con *Lb kefir* 8321, también están presentes cúmulos de bacterias más grandes cubiertas por una matriz extracelular.

Sin embargo, en la co-incubación con *Lb plantarum* 83114 provoca la dispersión de bacterias cubriendo casi la totalidad de la superficie. En este caso, las bacterias se distribuyen a lo largo de la superficie a diferencia de las cepas *Lb kefir* donde se forman grandes agregados de bacterias dejando expuesta la superficie de la cáscara.

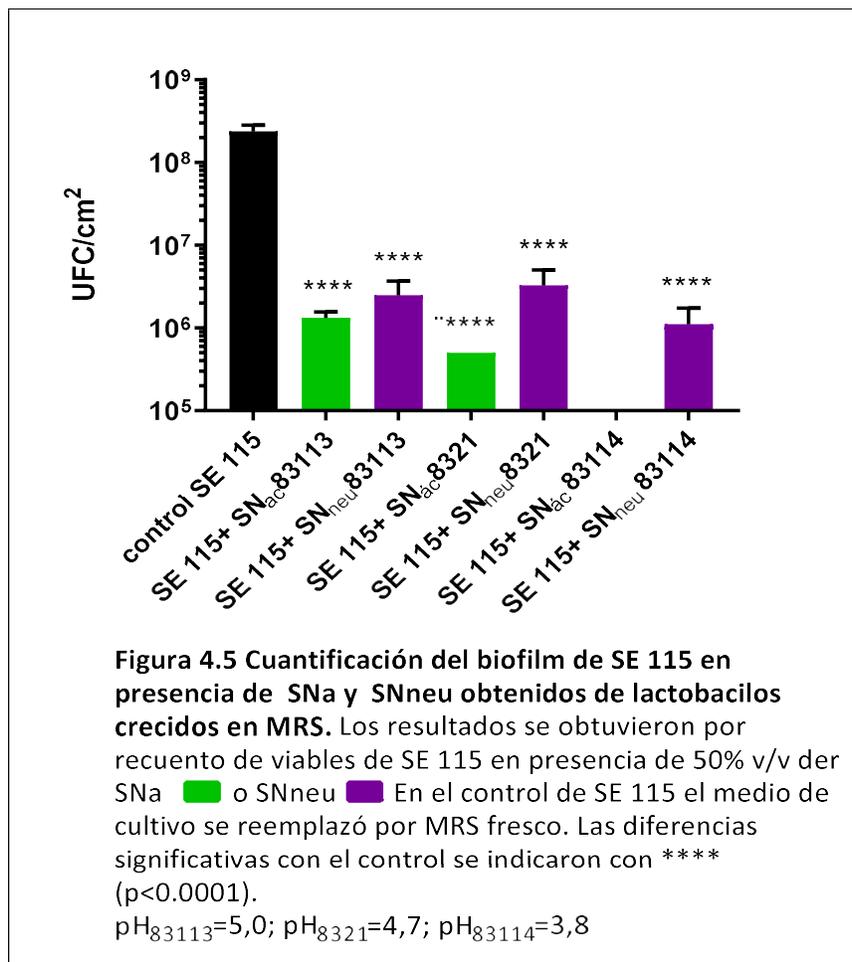
Por otro lado, se determinó mediante recuentos en MRS los lactobacilos presentes en el biofilm, como se muestra en la Figura 4.4.



La Figura 4.4 muestra que los lactobacilos fueron capaces de quedar adheridos sobre la superficie de la cáscara tanto durante la incubación 24 horas a 30°C en MRS (pre-incubación) así como durante 48 hs a 28°C en presencia de SE 115 (co-incubación). Los lactobacilos observados por microscopía se cuantificaron también por recuentos. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en el Capítulo 3 en superficie de poliestireno donde la incubación con lactobacilos disminuye los recuentos de *Salmonella*. Anteriormente, se demostró que los lactobacilos co-agregan con SE 115. Sin embargo, este comportamiento no se evidencia por microscopía. Thein *et al.* (2006) estudiaron el efecto de la incubación de *Lb acidophilus* sobre la formación de biofilm de *Candida albicans* encontrando una reducción significativa de los recuentos del patógeno. Los investigadores proponen que la inhibición del biofilm de *Candida* puede estar dada por una interacción física con el lactobacilo y por el crecimiento de estas bacterias o la producción de sus metabolitos además de la competencia por los nutrientes.

## 2.2 Efecto de sobrenadantes de lactobacilos en el biofilm de SE 115

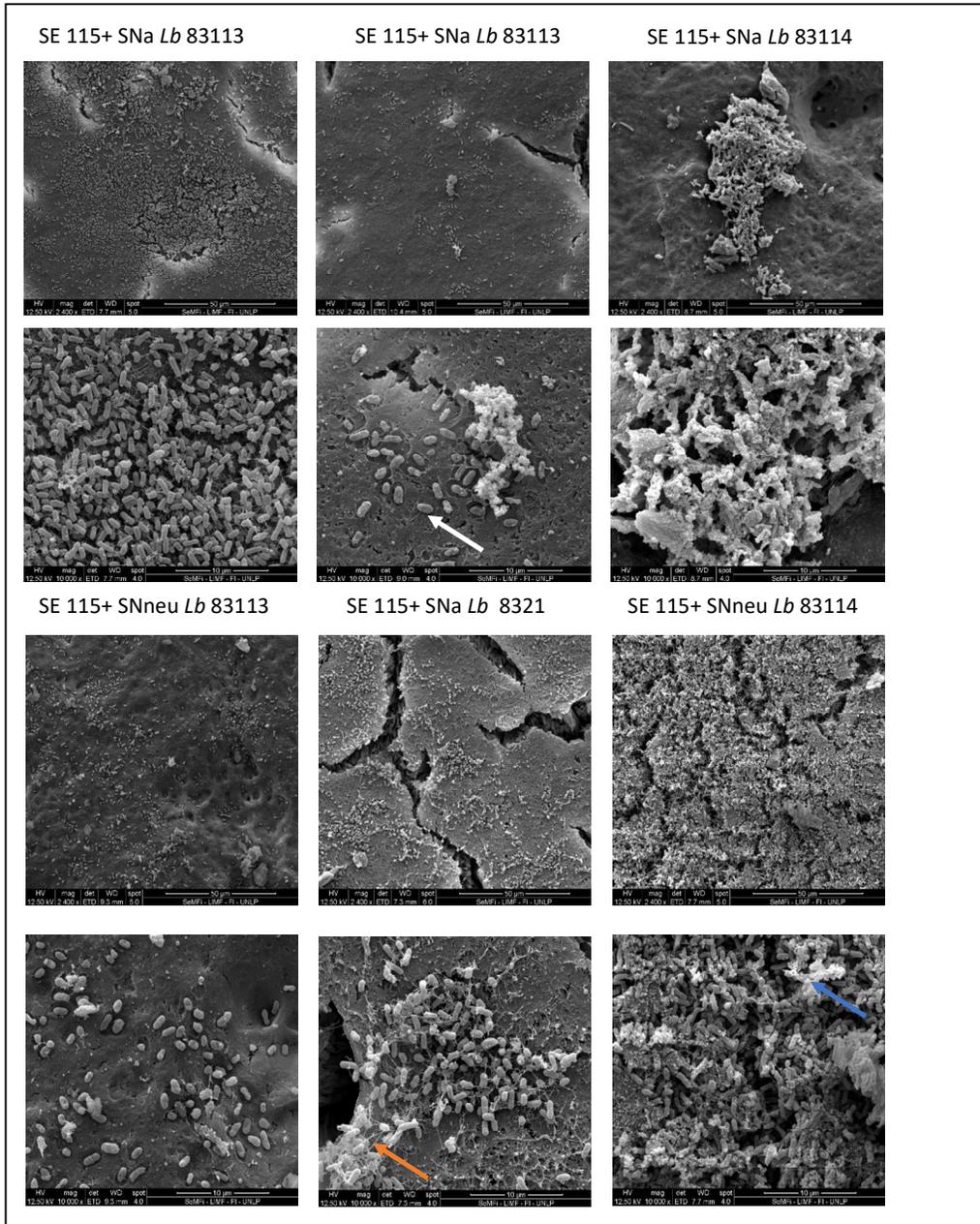
Como se demostró anteriormente en el Capítulo 3, los sobrenadantes de lactobacilos tienen un efecto inhibitorio en la formación de biofilm de SE 115 sobre poliestireno. Por lo tanto, en esta parte del trabajo, se estudió el efecto de los SN de lactobacilos a una concentración de 50% v/v crecidos en MRS a pH de cosecha (SNa) y neutralizado (SNneu) de las cepas *Lb kefir* 83113 y 8321 y *Lb plantarum* 83114 en la capacidad de SE 115 de formar biofilm sobre la cáscara de huevo mediante recuento de viables y SEM.



La incubación de *Salmonella* en BHI con sobrenadantes de lactobacilos resultó en una disminución significativa en el número de bacterias cercano a dos órdenes logarítmicos respecto del control de SE 115 con igual volumen de MRS. Tal como se había determinado anteriormente en el Capítulo 3, el tratamiento con el SNa de *Lb plantarum*

83114 inhibió el crecimiento de *Salmonella* debido al bajo pH alcanzado por este lactobacilo cuando se incubaba en MRS (pH=3,8). Los SNa de las cepas *Lb kefir* mostraron mayor capacidad de inhibición del biofilm de SE 115 en comparación con los SNneu, aunque no se encontraron diferencias significativas. Tampoco se observaron diferencias entre los SNneu de las distintas cepas de lactobacilos estudiadas. Estos resultados indican que por encima de pH=4,7, el tratamiento con sobrenadantes de lactobacilos crecidos en MRS inhibe el desarrollo de biofilm de *Salmonella* independientemente del pH.

En la Figura 4.6 se muestran las microfotografías obtenidas por SEM de la incubación de SE 115 en medio BHI con los sobrenadantes de lactobacilos.



**Figura 4.6** Microscopía electrónica de barrido del biofilm formado por SE 115 sobre cáscara de huevo en presencia de los SN de lactobacilos. Los resultados son en medio en BHI en presencia de 50% SNa y SNneu luego de 48 hs a 28°C. Las microfotografías corresponden a aumentos de 2400X (arriba) y 10000X (abajo). La flecha blanca señala células anómalas, la flecha naranja las fimbrias y la fecha azul la matriz extracelular.

La presencia de 50% de los SN de cultivos de lactobacilos resultó en la pérdida de la estructura del biofilm maduro de SE 115 que se había observado en la Figura 4.1. En la incubación con SNa de *Lb kefir* 83113 las bacterias se encuentran más dispersas a lo largo de la superficie y no se observa la formación de densos acúmulos de bacterias superpuestas. También hay una marcada reducción de matriz extracelular. La incubación con SNneu de esta cepa produjo una reducción mayor de la cantidad de bacterias adheridas a la superficie y no se observó producción de los componentes de la matriz extracelular.

En presencia de SNa de *Lb kefir* 8321 las células de *Salmonella* se observan anómalas, con el centro colapsado caracterizada por una mella en el centro (flecha blanca en la Figura 4.6) y una menor densidad de bacterias adheridas. En estas condiciones también se obtuvo una disminución del número de bacterias sobre la superficie de la cáscara respecto del SN de las otras cepas de lactobacilos como se estableció mediante recuentos. Con el SNneu de *Lb kefir* 8321 se observan cúmulos de bacterias con producción de matriz extracelular, aunque de mucha menos densidad que el control de SE 115.

El SNa de *Lb plantarum* 83114 inhibió extensivamente el desarrollo de *Salmonella* sobre la superficie. La fotografía mostrada representa el único sector donde se encontró una estructura adherida a la cáscara, y se pueden ver algunas células libres y un cúmulo recubierto de matriz. Sin embargo, la incubación de SE 115 con el SNneu de esta cepa resultó en una alta densidad de bacterias adheridas y en la producción de componentes de la matriz extracelular (flecha azul en la Figura 4.6), aunque en menor cantidad que el control de SE 115.

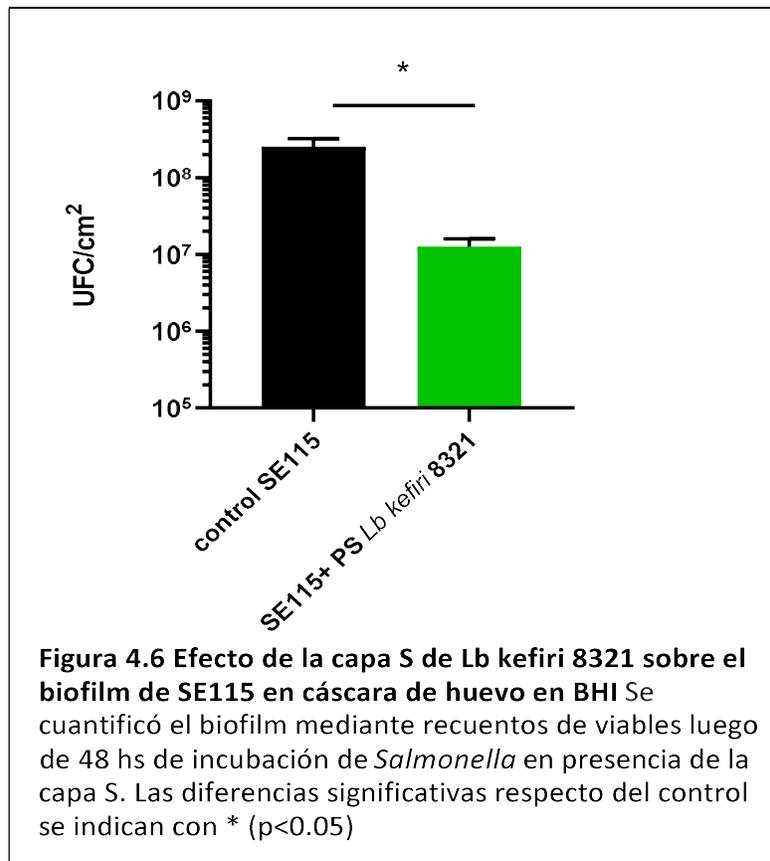
Los SNneu de *Lb kefir* mostraron un efecto inhibitorio en la capacidad de formación de biofilm de SE 115. En la incubación con el sobrenadante de *Lb kefir* 83113 se observan bacterias dispersas adheridas a la superficie mientras que en presencia de SNneu de *Lb kefir* 8321 se observan algunas bacterias agrupadas con producción de matriz. Zogaj *et al.* (2003) indicó que estas estructuras corresponden a fimbrias curli de *Salmonella*.

En un estudio reciente, se demostró mediante SEM que el sobrenadante ácido de *Streptococcus salivarius* y de *Lb rhamnosus* inhiben la formación de biofilm de *Staphylococcus epidermis* y de *Staphylococcus aureus* cuando se co-incuban durante 48

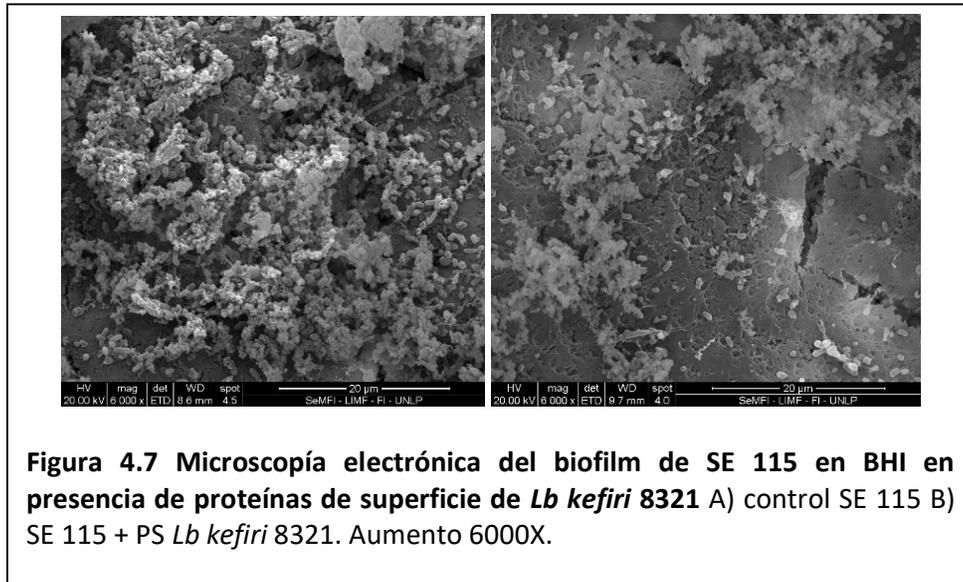
hs en BHI, obteniéndose un biofilm más débil con una densidad celular más baja (Frickmann *et al.*, 2018).

### 2.3 Efecto de las proteínas de superficie de *Lb kefir* 8321

Como ya demostramos en el capítulo 3, las proteínas extraídas de la superficie de lactobacilos inhiben la formación de biofilm de *Salmonella*. En esta parte del trabajo, se estudió el efecto sobre la capacidad de formación de biofilm de SE 115 en cáscara de huevo de las proteínas de superficie de *Lb kefir* 8321 extraídas con LiCl 5M, mediante recuento de viables y SEM. Los resultados de la incubación de SE 115 con 0.05 mg/ml de proteínas de superficie se muestran en las Figuras 4.6 y 4.7



El recuento de bacterias viables en el biofilm disminuyó un orden de magnitud respecto del control de SE 115 sin proteínas. Esto podría deberse a la inhibición de la adhesión de *Salmonella* a la superficie o bien a un efecto antibacteriano de estas proteínas. La estructura del biofilm formado observado mediante SEM se muestra en la Figura 4.7.



**Figura 4.7** Microscopía electrónica del biofilm de SE 115 en BHI en presencia de proteínas de superficie de *Lb kefir* 8321 A) control SE 115 B) SE 115 + PS *Lb kefir* 8321. Aumento 6000X.

En las microfotografías se observa que la adición de las proteínas de superficie disminuye la cantidad de bacterias en el biofilm, con una superficie de la cáscara más expuesta.

Dado la escasa bibliografía publicada sobre este tema, resulta difícil la comparación con resultados en otros trabajos. Sin embargo, en un trabajo reciente de Fonseca *et al.* (2019) estudiaron la inhibición de la formación de biofilm de *Salmonella* sobre la cáscara de huevo y su internalización mediante la cobertura con nanopartículas. En dicho trabajo encontraron que cuando la superficie es pre-tratada con las nanopartículas se inhibe significativamente el biofilm de *Salmonella* sobre la cáscara y disminuye la entrada de la bacteria al huevo, pero no elimina el biofilm de *Salmonella* si este estaba previamente formado.

Trabajos previos en otras superficies han demostrado que la bacteria Gram-negativa *Actinobacillus actinomycetemcomitans* secreta dispersina B, una proteína que puede dispersar los biofilms producidos por otras bacterias. Kaplan *et al.* (2004) encontraron que la dispersina B podría alterar la matriz extracelular del biofilm de *S. epidermidis* y dispersar la biopelícula. Por otro lado, la presencia de proteínas de capa S se ha correlacionado negativamente con la formación de biofilm en *B. cereus* (Auger *et al.*, 2009).

*Tannerella forsythia* es una bacteria que forma biopelículas orales y que posee una capa S compuesta de dos glicoproteínas, TfsA y TfsB (Lee *et al.*, 2006). En estas bacterias, la expresión de capa S en células que crecen en biofilm es significativamente mayor que en células planctónicas, mientras que el gen *wecC*, involucrado en la glicosilación de varias proteínas de superficie, es regulado negativamente en células del biofilm (Pham *et al.*, 2010). Una mutante carente de un gen funcional *wecC* mostró una mayor superficie hidrofóbica y un aumento de la formación de biopelículas en comparación con la cepa parental (Honma *et al.*, 2007). Estas mutantes carecían de una capa S normal y contenían proteínas TfsA y TfsB con una masa molecular más baja, debido a un menor grado de glicosilación (Posch *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que las proteínas de capa S o su grado de glicosilación pueden impedir la formación de biofilm.

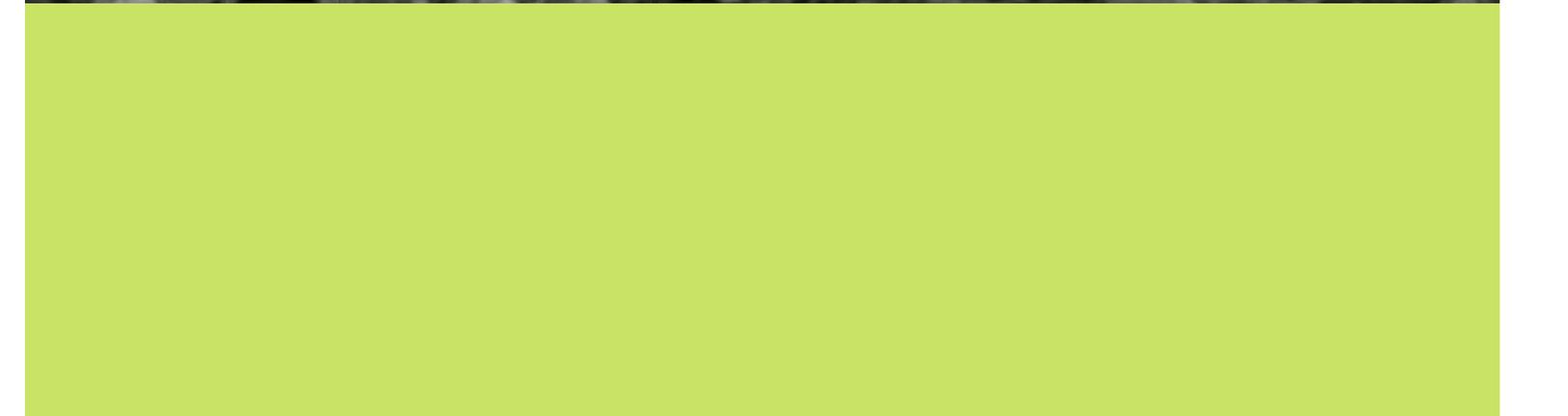
Anteriormente, se había observado una disminución de la cantidad de bacterias y un aumento de la producción de celulosa en el biofilm de SE 115 sobre poliestireno determinado mediante microscopía láser confocal (Figura 3.15). Dado que en estas condiciones se había observado una disminución del espesor del biofilm, y que las proteínas de capa S son el componente mayoritario de las proteínas de superficie de estos lactobacilos, podrían ser responsables de interferir con la maduración del biofilm.

## Conclusiones

- La cepa SE 115 tiene capacidad de formar un biofilm maduro sobre cáscara de huevo a las 48 hs de incubación en medio BHI produciendo una matriz polimérica extracelular abundante, donde se pueden observar clústeres de bacterias adheridas entre sí a través de fimbrias.
- El tratamiento con lactobacilos, sus metabolitos presentes en el sobrenadante, así como las proteínas de superficie de *Lb kefir* inhibieron la formación de biofilm de *Salmonella* sobre cáscara de huevo. Estos resultados se corresponden con el efecto del sobrenadante observado anteriormente en el Capítulo 3. Los sobrenadantes ácidos y neutralizados de los lactobacilos redujeron hasta dos unidades logarítmicas los recuentos de SE 115 en el biofilm, mientras que el SNa de *Lb plantarum* inhibió el crecimiento de *Salmonella* a niveles no detectables por la técnica de recuento de viable. El SNa de *Lb kefir* 8321 resultó en el tratamiento que afectó en mayor medida la capacidad de formación de biofilm de SE 115, posiblemente debido a la presencia de ácidos orgánicos, proteínas de capa S y otros metabolitos que pueden inhibir el desarrollo de estas estructuras.
- Tanto la pre-incubación como la co-incubación con cepas de *Lb kefir* 83113 y 8321 y *Lb plantarum* 83114 resultaron en la disrupción de la estructura del biofilm de *Salmonella*. La mayor inhibición se observó durante la incubación de SE 115 y *Lb kefir* donde los recuentos resultaron en más de un orden de magnitud menor en presencia de lactobacilos. También se observó menor densidad de bacterias y de matriz extracelular mediante SEM.

ANEXO

---



# ANEXO

## 1. Determinación de la sensibilidad a gentamicina

La gentamicina es un antibiótico activo frente a bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli* y *Salmonella*, y tiene una limitada capacidad para penetrar las células eucarióticas. En este trabajo, se determinó la sensibilidad de las cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE) 101, 105 y 115, *Salmonella* Typhimurium (ST) 102 y *Salmonella* Gallinarum (SG) 109 frente al tratamiento durante una hora con distintas concentraciones de gentamicina, como se muestra en el siguiente esquema a modo de ejemplo para la cepa ST 102 y ST 109:

De esta manera, las cepas sensibles al tratamiento con la concentración del antibiótico no desarrollarán crecimiento en placa luego de la incubación (signo -), mientras que las cepas resistentes a la concentración de gentamicina, son capaces de desarrollar formando colonias en la placa de agar LB (signo +). Los resultados del ensayo de sensibilidad a gentamicina para las cepas estudiadas se muestran en la Tabla.

Cepa <i>Salmonella</i>	Concentración gentamicina (mg/ml)				
	0,01	0,05	0,1	0,15	0,2
SE CIDCA 101	+	+	-	-	-
SE CIDCA 105	+	+	+	+	-
SE CIDCA 115	+	+	+	-	-
ST CIDCA 102	+	+	+	+	-
SG CIDCA 109	+	+	+	+	-

**Tabla A1. Sensibilidad de *Salmonella* a distintas concentraciones de gentamicina** El signo (+) indica desarrollo de colonias de crecimiento en la placa, luego del tratamiento con gentamicina (resistente), mientras que el signo (-) indica ausencia del desarrollo de crecimiento en la placa (la bacteria es sensible).

Como se observa en la Tabla A1, todas las cepas evaluadas son sensibles al tratamiento con antibiótico a una concentración de 0,2 mg/ml. Para las cepas *Salmonella* SE 101 y SE 115, concentraciones de gentamicina de 0,1 mg/ml y 0,15 mg/ml respectivamente, resultaron inhibitorias. En trabajos previos en nuestro laboratorio con la cepa SE 101

se encontraron resultados similares para la sensibilidad a gentamicina (Golowczyc, 2008), encontrándose una concentración bactericida de gentamicina de 0,1 mg/ml.

## **2. Adhesión sobre células Caco-2 TC7**

Los cultivos de células *in vitro* han sido un modelo ampliamente utilizados para estudiar la interacción entre *Salmonella* y otros microorganismos y células eucarióticas (Ochoa y Rodriguez, 2005). Utilizando el modelo de células de epitelio intestinal Caco-2/TC7 se analizó la capacidad de asociación e invasión de *Salmonella enterica* serovariedades Enteritidis, Typhimurium y Gallinarum.

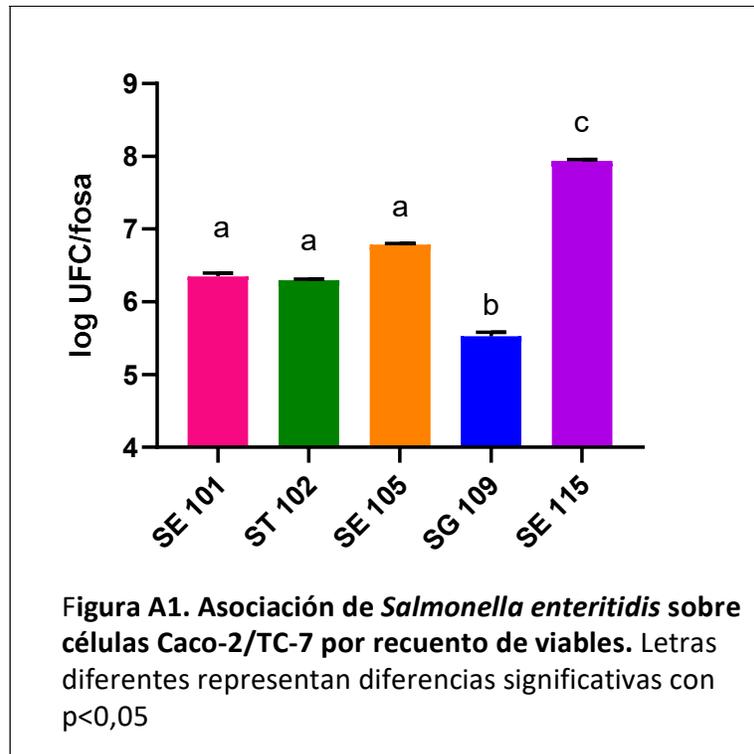
La línea celular Caco-2/TC-7 es un clon de la línea celular intestinal Caco-2, cuya ventaja es que las células se diferencian más rápido que las Caco-2 llegando a confluencia a los 7 días y forman una monocapa más homogénea (Servin *et al.*, 2004).

La adhesión depende de las propiedades superficiales de las bacterias. Las bacterias con alta hidrofobicidad suelen presentar fuertes interacciones con las células de la mucosa. La interacción inicial puede ser débil, a menudo reversible y precede a los procesos de adhesión posteriores mediados por mecanismos más específicos que involucran proteínas de la superficie celular y ácidos lipoteicoicos (Botes *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009).

Raghunathan *et al.* (2011) han encontrado que la expresión de la adhesina SadA en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium está implicada en la agregación celular, en la formación de biopelículas y una mayor adhesión a las células epiteliales Caco-2 intestinales humanas. De esta manera, la capacidad de *Salmonella* de adherirse a células en cultivo y la adhesión a superficies abióticas podrían estar vinculadas. Se han encontrado además que proteínas autotransportadoras pueden contribuir a la adhesión, colonización y formación de biofilm de varios patógenos tales como *Escherichia coli* shigatoxigénica, *Yersinia pestis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Wells *et al.*, 2008; Felek *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Se estudió la asociación en células Caco-2/TC-7 de cinco cepas de *Salmonella* de distinto origen que mostraron diferente porcentaje de autoagregación e hidrofobicidad, *Salmonella* Enteritidis (SE) 101, 105 y 115, *Salmonella* Typhimurium (ST) y *Salmonella* Gallinarum (SG) 109. Para ello, se evaluó el número de bacterias adheridas sobre la monocapa de células en función de la concentración inicial de

bacterias agregadas en la suspensión. Los resultados se expresaron como UFC/ fosa, es decir la cantidad de bacterias adheridas a las células crecidas en el pocillo de la placa de cultivo y corresponden al promedio de dos ensayos independientes con triplicado.



Los estudios de asociación a células Caco-2 mostraron que la cepa SE 115 se asocia en el orden de  $9 \times 10^7$  UFC/fosa. Teniendo en cuenta que inicialmente el cultivo de *Salmonella* tenía una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/fosa, esto representa un porcentaje de asociación de 90%. Por otro lado, el recuento de SE 101 y 105 y ST 102 adheridas a las células del cultivo fueron del orden de  $2-6 \times 10^6$  UFC/fosa, es decir 6% de asociación. La cepa que menor asociación a células presentó fue SG 109 alcanzando valores de  $3 \times 10^5$  UFC/fosa, lo que representa un porcentaje de asociación de 0,3%.

Estudios previos del grupo de trabajo con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis 101 sobre células Caco-2/TC-7 mostraron que un cultivo inicial de  $1 \times 10^8$  UFC/fosa, se asocia en el orden de  $6-7 \times 10^6$  UFC/fosa, esto es 6,5% de las bacterias iniciales se asociaron a las células en cultivo (Golowczyc, 2008).

Otros autores han encontrado que cepas de *Salmonella* tiene capacidad de asociarse células Caco-2 en 2,5% y que estructuras como los flagelos son importantes en estas

interacciones (Salei *et al.*, 2016), aunque otros factores pueden estar involucrados (van Asten *et al.*, 2004). Según el serotipo de *S. enterica*, se identificaron agrupaciones de genes para más de 10 adhesinas fimbriales diferentes (Wagner y Hensen, 2011), con fimbrias de tipo I (Korhonen *et al.*, 1980), pili tipo IVB en *S. enterica* serovar Typhi (Tam *et al.*, 2006), fimbrias polares largas (Lpf) (Bäumler y Heffron, 1995) y fimbrias agregativas delgadas (Tafi) (Sukupolvi *et al.*, 1997). Además, se han identificado adhesinas autotransportadoras como ShdA, MisL y SadA (Kingsley *et al.*, 2002) y las adhesinas repetitivas grandes de tipo I, SiiE y BapA la cual está implicada además en la formación de biofilm de *Salmonella* (Latasa *et al.*, 2005; Gerlach *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la expresión del gen *csgD* que regula la formación de biofilm de *Salmonella* a través de la expresión de curli y celulosa, es biestable. Es decir que se puede tener al mismo tiempo células expresando el gen formando biofilm y otras en estado planctónico que no lo expresan (“gen apagado”) (Grantcharova *et al.*, 2010). Es decir que la regulación del fenotipo no es poblacional, sino que es un fenómeno regulatorio mediado a nivel de una sola célula. Este cambio de fenotipo en el ciclo de vida de *Salmonella* permite que los genotipos se mantengan en medioambientes fluctuantes, mejorando las chances de la transmisión de la bacteria (Ackermann *et al.*, 2015). Cuando *Salmonella* se encuentra inmediatamente con su huésped, las células planctónicas serían capaces de producir una infección. Por el contrario, si la bacteria no está frente a una célula huésped, las células formarán biofilm para sobrevivir durante mucho tiempo hasta que surge la oportunidad de infección. Este paso impredecible en el ciclo de vida de *Salmonella* pone igual presión de selección en fenotipos de virulencia y de persistencia (MacKanzie *et al.*, 2017).

En este marco, las cinco cepas de *Salmonella* evaluadas SE 101, 105 y 115, ST 102 y SG 109 fueron capaces de asociarse en distinto grado a células de epitelio intestinal Caco-2, con un porcentaje de asociación variable entre 0,3% y 90%. Además de ser una fuerte formadora biofilm en superficies abióticas, SE 115 presentó una alta capacidad de asociación sobre células Caco-2, mostrando que esta cepa ha logrado adquirir las ventajas para sobrevivir en los distintos estadios del ciclo de vida de *Salmonella* dentro y fuera de su hospedador. En este sentido, resulta interesante el estudio de la cepa SE 115 y su interacción con lactobacilos y sus metabolitos, como alternativa de biocontrol de este patógeno.

### 3. Concentración inhibitoria mínima de los sobrenadantes de lactobacilos

El estudio de la incubación de los SN de lactobacilos con SE 115 en medio BHI mostró que a pH de cosecha, los SN de lactobacilos que se habían crecido en MRS, inhiben la formación de biofilm de *Salmonella* a partir de una concentración del 30%. En este estudio, se determinó la concentración inhibitoria mínima de los SNa. Para ello se prepararon tubos con medio BHI el cual se reemplazó en parte por concentraciones crecientes de SNa de lactobacilos crecidos en MRS y se inocularon con SE 115. Los tubos se incubaron 24 hs a 37°C y aquellos que no presentaron crecimiento se consideraron inhibitorios. Los resultados se muestran en la Tabla A1.

Sobrenadante lactobacilos a pH de cosecha (SNa)	CIM (%SNa)
<i>Lb plantarum</i> 83114	15
<i>Lb kefir</i> 8321	40
<i>Lb. delbrueckii subs. lactis</i> 133	20

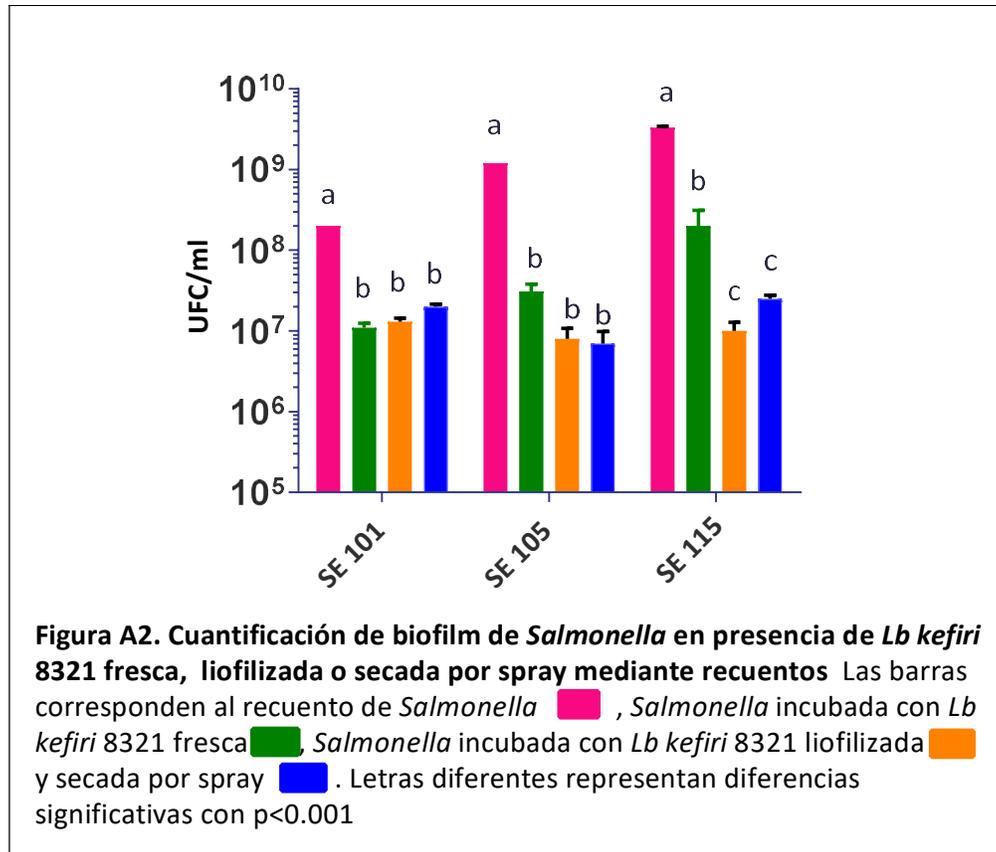
**Tabla A2. Concentración inhibitoria de SNa de lactobacilos crecidos en MRS sobre SE 115.** *Salmonella* se creció en BHI en presencia de SN de lactobacilos. El pH de los SNa corresponden a SN<sub>83114</sub>=3,8; SN<sub>8321</sub>=4,7; SN<sub>133</sub>=4,1.

Como se muestra en la tabla, a partir de una concentración de 15% de SN<sub>83114</sub> se inhibe el crecimiento de SE 115 mientras que la concentración fue de 20% para SN<sub>133</sub> y de 40% de SN<sub>8321</sub>. A medida que disminuye el pH, la cantidad de SNa requerida para inhibir el crecimiento de *Salmonella* es menor.

### 4. Formación de biofilm de *Salmonella* co-incubada con *Lb kefir* 8321 liofilizada

La liofilización es una técnica utilizada para conservar alimentos pero que puede emplearse para la preservación de la viabilidad de las bacterias. En este estudio una suspensión de *Lb kefir* 8321 en D (+)-sacarosa 250 nM se sometió a liofilización. La viabilidad luego del tratamiento se determinó por recuento obteniéndose valores de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Para determinar la capacidad inhibitoria del lactobacilo sometido a liofilización, se co-incubó cepas de *Salmonella* formadoras de biofilm en presencia de

*Lb kefir* 8321 liofilizada y sin liofilizar (fresca) en LB a 28°C y luego de 48 horas se realizaron recuentos de viables en agar LB como se muestra en la Figura A2.



Como se observa en la Figura A2, tanto el lactobacilo fresco como liofilizado inhibieron significativamente la formación de biofilm de las cepas de *Salmonella* SE 101, 105 y 115. La efectividad de los lactobacilos para inhibir el desarrollo de patógenos depende del número de células viables, siendo  $10^7$  a  $10^9$  UFC la cantidad recomendada por dosis de formulación para ser considerados probióticos (Ding y Shah, 2009; Mastromarino *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2014). Por lo tanto, durante el diseño de productos probióticos, el principal requisito tecnológico es la estabilidad microbiana durante el proceso de producción de biomasa (para incluir el número requerido microorganismos viables en el producto final) y durante el período de vida útil (du Toit *et al.*, 2013; Domig *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2014). La liofilización y la encapsulación son métodos ampliamente aplicados para preservar y proteger viabilidad microbiana (Pliszczak *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2013). En este sentido, la preservación de la viabilidad y de la capacidad de

inhibición del biofilm de *Salmonella* de la cepa de *Lb kefir* 8321 luego de la liofilización indican que este lactobacilo podría resultar de interés para su utilización en el biocontrol de *Salmonella* la industria alimentaria.

# CONCLUSIÓN GENERAL

---



# CONCLUSIÓN GENERAL

La globalización del comercio y el estilo de vida aseguran que los factores responsables del surgimiento de enfermedades están más presentes que nunca. Las formas actuales de producción de alimentos con elevada demanda por parte de los consumidores y la tendencia a alimentos sanos, seguros, menos procesados, libres de agentes químicos agregados presentan un desafío para garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos. A pesar de los avances biotecnológicos, los alimentos de origen animal todavía representan un problema para la salud debido a la presencia de patógenos, lo que causa además pérdidas de confianza y, en consecuencia, una caída de la demanda. *Salmonella* representa un importante problema de salud pública mundial y es una amenaza bacteriana zoonótica emergente en la industria avícola. Diversos casos registrados de salmonelosis en humanos muestran orígenes avícolas. Debido a la persistencia de *Salmonella* en biofilms en entornos de procesamiento de alimentos después de la limpieza y el saneamiento, es sumamente importante el estudio de nuevas estrategias de control y erradicación en la industria avícola. La formación de biofilms es un proceso complejo y altamente regulado que depende de la cepa bacteriana, las condiciones ambientales y las características de la superficie de adhesión. Además, la extensión de la vida útil de los alimentos con simples procedimientos tecnológicos accesibles para economías más pequeñas, la presencia de patógenos resistentes y la mejora de la salud animal y humana por medios naturales también debe tenerse en cuenta.

La erradicación de *Salmonella* de superficies presente en granjas avícolas y de sus productos derivados es un tema actualmente el estudio. Trabajos previos demuestran que los métodos de limpieza y desinfección resulta inefectivo para la erradicación de esta bacteria en contextos de producción avícola (Rose *et al.*, 2000; Davies y Breslin, 2003; Ziech *et al.*, 2016) mostrando una alta prevalencia de *Salmonella* en muestras ambientales después de la limpieza y desinfección. De esta manera, el uso de estrategias alternativas (solas o en combinación con otros antimicrobianos) que permitan el control de *Salmonella* en huevos es un campo de investigación actual sumamente relevante.

Por mucho tiempo, el uso de microorganismos competidores que controlan el desarrollo de patógenos ha sido ampliamente utilizado para mejorar la conservación de alimentos. La comprensión de los mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas es un campo de estudio en crecimiento y la preservación biológica para asegurar la calidad higiénica de los alimentos se ha convertido en una importante herramienta. Las bacterias lácticas han sido parte de alimentos crudos y fermentados desde tiempos muy antiguos y por este motivo la asociación con la salud ha crecido entre los consumidores y se han vuelto cada vez más populares. En este contexto, las bacterias lácticas pueden representar una alternativa segura para evitar el crecimiento de microorganismos que pueden deteriorar los alimentos y causar enfermedades. Los organismos GRAS (generalmente reconocidos como seguros) ofrecen una alternativa para desarrollar alimentos libres de patógenos, particularmente evitando la contaminación, con un procesamiento mínimo y menor uso de aditivos mientras se mantienen las características sensoriales del alimento, con un impacto positivo en la calidad y la seguridad. La producción de ácidos orgánicos y una disminución del pH constituyen los principales mecanismos de biopreservación en alimentos fermentados. Sin embargo, los lactobacilos pueden producir otros antimicrobianos como metabolitos de bajo peso molecular (reuterina, reuteriicina, diacetilo, ácidos grasos), peróxido de hidrógeno, compuestos antifúngicos (propionato, fenilactato, hidroxifenilactato y 3-hidroxiácidos grasos) y bacteriocinas que pueden utilizarse en la bioconservación de alimentos. Estos y otros enfoques pueden usarse para prevenir y / o controlar la formación de biopelículas por bacterias patógenas.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una gran variabilidad de la capacidad de formación de biofilm entre las cepas de *Salmonella*, sobre distintas superficies abióticas presentes en la industria avícola y en diferentes condiciones de cultivo. Esta característica puede influir en la capacidad de la bacteria de persistir en el ambiente y conformar una potencial fuente de contaminación. Estos resultados deberán ser tenidos en cuenta para la aplicación de tratamientos preventivos de la contaminación de superficies con *Salmonella* o en la aplicación de nuevos métodos de control de este patógeno.

En nuestro trabajo los lactobacilos, sus metabolitos, y sus proteínas aisladas de superficie mostraron capacidad para disminuir el biofilm formado por una cepa de *S*

Enteritidis aislada de una granja local. Así mismo, las bacterias lácticas, sus metabolitos presentes en el sobrenadante de cultivos, así como las proteínas aisladas de superficie, fueron efectivas para disminuir la formación de biofilm de *Salmonella* sobre cáscara de huevo, indicando que esta estrategia puede representar una manera segura y efectiva para disminuir la contaminación de *Salmonella* en granjas avícolas que persisten en el ambiente formando biofilms. Por otro lado, los lactobacilos conservados mediante técnicas de preservación como secado en spray y liofilización no afectaron la capacidad de inhibir la formación de biofilm de *Salmonella*. Esto puede constituir una forma de aplicación futura fácilmente manejable por parte de los productores avícolas.

Por lo tanto, las cepas de *Lactobacillus* aisladas de alimentos empleadas en este estudio pueden aplicarse como estrategia de protección de superficies frente a la aparición de biofilms de *Salmonella*. Dado que encontramos que a las 24 horas *Salmonella* forma un biofilm maduro, esta aplicación deber realizarse en forma preventiva, para evitar la adhesión y maduración del biofilm. Es importante destacar que las cepas de lactobacilos interfirieron con la formación de biofilms de *Salmonella* en condiciones *in vitro* (en condiciones óptimas y de crecimiento estático para cepas de lactobacilos). En el ambiente alimentario la baja disponibilidad de nutrientes y la temperatura adversa son condiciones que podrían reducir el crecimiento y supervivencia de lactobacilos y esto sería una limitación para el uso de esta estrategia. Por otro lado, podrían reemplazarse tal vez parcialmente el uso de desinfectantes potencialmente tóxicos para la desinfección de los huevos por el sobrenadante de lactobacilos en forma de spray para cubrir mejor la superficie o mediante inmersión. En el lavado de huevos para reducir la carga microbiana de la cáscara, es importante tanto la temperatura utilizada como el tiempo de contacto del agua con el huevo ya que si se deja mucho tiempo esto puede provocar la entrada de agua. En algunos países la inmersión no es una técnica permitida porque puede aumentar la probabilidad de entrada de contaminantes. Otro factor a tener en cuenta es el momento de aplicación. Luego de la salida del huevo, la cutícula aún está húmeda y tiene una estructura abierta y porosa. Luego de los 7 días, la estructura se aplana y pierde parte de su capacidad para resistir el paso de líquidos. La práctica comercial actual tiene como objetivo minimizar el tiempo entre la colocación, la clasificación, el embalaje y la entrega al punto de venta y el lavado debe realizarse dentro de las 24 a

48 horas de la puesta. Una técnica utilizada es el aceitado de huevos para sellar los poros luego del lavado y se ha demostrado que esto preserva la calidad de la albúmina e impide el paso de microorganismos a través de la cáscara. Sin embargo, esta práctica no está permitida en varios países como en la Unión Europea, aunque se utiliza en Estados Unidos en producciones donde existe un riesgo de inadecuada refrigeración. En países desarrollados, la tendencia en la producción de huevos es el uso de sistemas sin aulas, a campo libre y establo, lo que podría tener un impacto en la calidad microbiológica de los huevos. También sigue este modelo la producción a pequeña escala. En estos casos, las técnicas de desinfección pueden volverse más importantes ya que las gallinas ponedoras están más en contacto con la basura, el estiércol y microorganismos que viven en el medio ambiente.

Es importante resaltar que la utilización de lactobacilos en combinación con otras estrategias de control puede redundar en una mejora de la calidad de los alimentos, tal como plantea la tecnología de barreras múltiples. En este caso, el empleo de lactobacilos y sus metabolitos se podría aplicar junto con otras maniobras de prevención y conservación de los productos derivados y de contaminaciones ambientales tales como tratamientos térmicos, refrigeración, radiación, aceites esenciales, bacteriófagos, entre otros métodos, que inhiben el desarrollo de patógenos atacando diferentes objetivos.

# PERSPECTIVAS

---



# PERSPECTIVAS

En la actualidad, muy pocos trabajos publicados dan cuenta de los mecanismos involucrados en la inhibición de biofilms mediante lactobacilos. En este sentido, se propone profundizar el estudio de la expresión de genes vinculados a diferentes estructuras y procesos involucrados en la formación de biofilm de *Salmonella* tales como producción de polisacáridos, proteínas de superficie y *quorum sensing* mediante el empleo de lactobacilos y sus metabolitos presentes en el sobrenadante del cultivo.

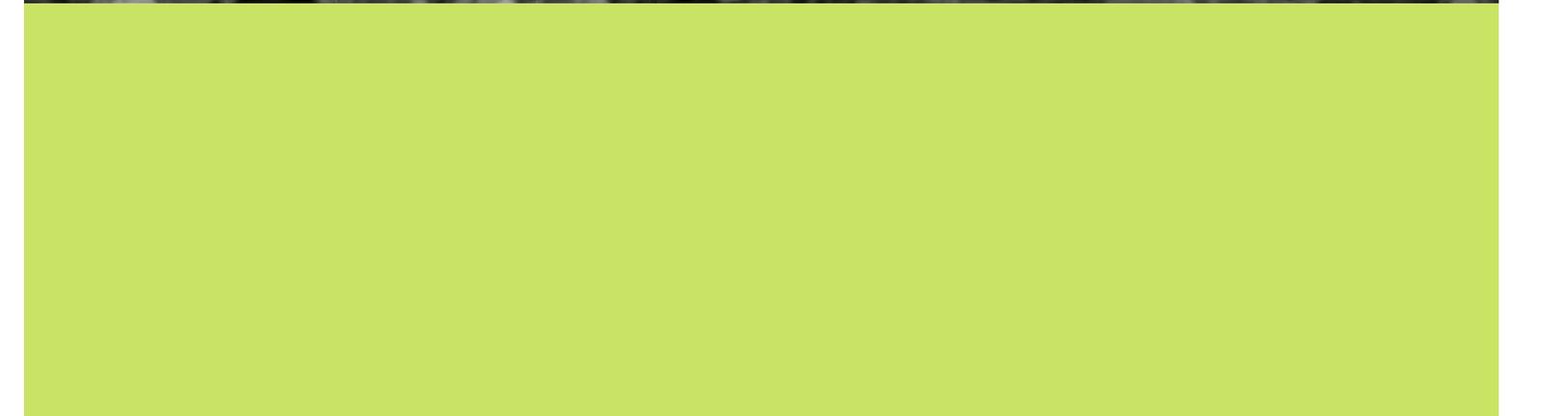
Para confirmar si la capa S y los exopolisacáridos de bacterias lácticas son determinantes de la capacidad de formar biofilm, se propone purificarlas y determinar los efectos que produce su presencia y ausencia en la formación de biofilm.

Además, ya que se sabe que la mayor parte de los biofilms en este tipo de ambientes son mixtos, se plantea estudiar los mecanismos de inhibición de *Salmonella* en estas estructuras para comprender los efectos de dicha interacción, así como identificar los genes diferenciales expresados en estas condiciones de crecimiento en biofilm en tiempo real.

Por último, se proyecta evaluar la efectividad de la aplicación de lactobacilos y sus metabolitos en contextos de producción avícola como método de biocontrol de biofilms de *Salmonella*.

# APÉNDICE

---



# APÉNDICE

## 1. Medios de cultivo y *buffers* empleados

### **Caldo Luria-Bertani (LB)**

Triptona 10 g/L

Extracto de levadura 5 g/L (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia)

NaCl 10 g/L

pH 7,0

### **Ágar LB**

Caldo LB adicionado con ágar-ágar en concentración 15 g/L.

### **Caldo Brain Heart Infusion (BHI) (OXOID Ltd, Inglaterra)**

Infusión de cerebro y corazón (sólidos) 8,0 g/L

Digerido péptico de tejido animal 5,0 g/L

Digerido pancreático de caseína 16,0 g/L

Cloruro sódico 5,0 g/L

Glucosa 2,0 g/L

Fosfato disódico de hidrógeno 2,5 g/L

pH 7,4 ±0,2

### **Agar BHI**

Caldo BHI adicionado de agar-agar en concentración 15 g/L.

### **Caldo MRS (Difco, Detroit, USA)**

Peptona 10 g/L

Extracto de carne 10 g/L

Extracto de levadura 5 g/L

D (+) glucosa 20 g/L

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L

Tween 80,1 g/L

Citrato ácido de amonio 2 g/L

Acetato de sodio 5 g/L

MgSO<sub>4</sub> 0,1 g/L

MnSO<sub>4</sub> 0,05 g/L

pH 6,5 ± 0,2

**Agar MRS**

Caldo MRS adicionado con agar-agar en concentración 15 g/L.

**Agar Hektoen entérico** (Britania, Bs As, Argentina)

Proteasa peptona 12 g/L

Extracto de levadura 3 g/L

Sales biliares 9 g/L

Lactosa 12 g/L

Sacarosa 12 g/L

Salicina 2 g/L

Cloruro de solio 5 g/L

Tiosulfato de sodio 5 g/L

Citrato de hierro y amonio 1,5 g/L

Azul de bromotimol 0,065 g/L

Fucsina ácida 0,1 g/L

Agar 14 g/L

pH 7,5 ± 0,2

**Buffer PBS**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,14 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,79 g

NaCl 9 g

Agua bidestilada c.s.p 1 L

pH 7,4

**Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)** (Gibco, Grand Island, N.Y., USA)

Suero fetal bovino Inactivado (PAA) 180 ml

Aminoácidos no esenciales (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, MD, USA) 13 ml

Penicilina/ Streptomycin (1000 IU/ml, 1000 µg/ml) 13 ml

Gentamicina (50 mg/ml) Parafarm, aporiti SACIFIA, Buenos Aires, Argentina 10 ml

NaHCO<sub>3</sub> 2 g/l

Agua farmacológica c.s.p 1 l

pH 7,0 ± 0,2

El suero fetal bovino se inactiva 30 min a 60 °C. Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

**Medio DMEM base**

Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium

(DMEM), (Gibco, Grand Island, N.Y., USA) 1000 ml

NaHCO<sub>3</sub> 2 g/l

pH 7,0 ± 0,2

Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

**2. Corrida electroforética SDS**

• **Acrilamida- bisacrilamida**

Acrilamida 48 g

Bisacrilamida 1,5 g

H<sub>2</sub>O bidestilada c.s.p 100 ml

Se conserva entre 7 y 10 °C.

• **Buffer de corrida 5X**

Glicina 72 g

Tris 15 g

HCl 0,225 M

SDS 5 g

H<sub>2</sub>O bidestilada c.s.p 1000 ml

Llevar a pH 8,25 aproximado con HCl

• **Buffer separador 4 X**

Tris 27,2 g

SDS 0,6 g

TEMED 0,6 ml

H<sub>2</sub>O bidestilada c.s.p 150 ml

• **Buffer *Stacking* (separador)**

Tris 3 g

SDS 0,2 g

TEMED 0,2 ml

H<sub>2</sub>O bidestilada c.s.p 50 ml

- **Buffer muestra**

Buffer stacking 4 ml

SDS 0,16 g

Glicerol 4 ml

Azul de bromofenol 1 gota

B-mercaptoetanol 5%

**Preparación de geles**

	<b>Buffer separador (ml)</b>	<b>Buffer Stacking (ml)</b>	<b>Agua bidestilada (ml)</b>	<b>Acrilamida- bisacrilamid a 30.8% (ml)</b>	<b>Persulfato de amonio 10% (µl)</b>
<b>Gel separador acrilamida- bisacrilamida*</b>	2,50	-	3,25	4,25	70
<b>Gel <i>stacking</i></b>	-	0,875	0,98	0,455	45

\*(1 mm espesor)

**Solución de fijación 1:** 30 ml etanol 96° + 2 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % p/p + 68 ml agua destilada.

**Solución de fijación 2:** 4 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % p/p + 196 ml agua destilada

**Solución de Coomasie:** 18 ml etanol 96° + 7 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % p/p + 15 gr (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 75 ml agua destilada + 1 ml Coomasie G 250 2 % p/V.

# BIBLIOGRAFÍA

---



# BIBLIOGRAFÍA

Abdallah, F. B., Lagha, R., Khaled, S. A. I. D., Kallel, H., Gharbi, J. (2014). Detection of cell surface hydrophobicity, biofilm and fimbriae genes in Salmonella isolated from tunisian clinical and poultry meat. *Iranian journal of public health*, 43(4), 423.

Abdulla, A. A., Abed, T. A., & Saeed, A. M. (2014). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of six Lactobacillus strains. *Microbiology Research Journal International*, 381-391.

Abeyundara, P. D. A., Dhowlaghar, N., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., Mahmoud, B., Sharma, C. S., Ma, D. P. (2018). Salmonella enterica growth and biofilm formation in flesh and peel cantaloupe extracts on four food-contact surfaces. *International journal of food microbiology*, 280, 17-26.

Ackermann, M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 497.

Agarwal, R. K., Singh, S., Bhilegaonkar, K. N., Singh, V. P. (2011). Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different Salmonella serotypes. *International Food Research Journal*, 18(4), 1493.

Aguirre, M., Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(2), 95-107.

Ahmad, I., Rouf, S. F., Sun, L., Cimdins, A., Shafeeq, S., Le Guyon, S., Römling, U. (2016). BcsZ inhibits biofilm phenotypes and promotes virulence by blocking cellulose production in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Microbial cell factories*, 15(1), 177.

Al-Mathkhury, H. J. (2012). Inhibitory effect of lactobacilli filtrate on Klebsiella pneumoniae biofilm. *Iraqi Academic Scientific Journal*, 11(2), 168-179.

Almeida C, Azevedo NF, Santos S, Keevil CW, Vieira MJ. (2011). Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH). *PLoS One*, 6:e14786. 30.

Annous, B. A., Fratamico, P. M., Smith, J. L. (2009). Scientific status summary: quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *Journal of food science*, 74(1), R24-R37.

Anriany YA, Weiner RM, Johnson JA, De Rezende CE, Joseph SW. (2001). Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype *Applied and Environmental Microbiology* 67(9):4048–4056

Anriany, Y., Sahu, S. N., Wessels, K. R., McCann, L. M., Joseph, S. W. (2006). Alteration of the rugose phenotype in waaG and ddhC mutants of Salmonella enterica serovar

Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5002–5012.

Antara, N. S., Gunam, I. B. W., Kencana, P. K. D., Utama, I. M. S. (2019). The role of lactic acid bacteria on safety and quality of fermented foods. *AIP Conference Proceedings*. 2155, 1, p. 020005

Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jegou, G., Guzzo, J. (2016). Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology*, 53, 51-59.

Arnold J, Bailey G. (2000). Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poultry Science*, 79(12):1839-1845.

Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I, Haertle T. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal Food Microbiology*, 87(1–2):63–73.

Arena, M. P., Capozzi, V., Spano, G., Fiocco, D. (2017). The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7), 2641-2657.

Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., Gohar, M. (2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6616-6618.

Austin JW, Sanders G, Kay W, Collinson S. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiology, Lett.* 162:295–301.

Aya Castañeda, M. D. R. A., Sarnacki, S. H., Llana, M. N., Guerra, A. G. L., Giacomodonato, M. N., Cerquetti, M. C. (2015). Dam methylation is required for efficient biofilm production in *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *International journal of food microbiology*, 193, 15-22.

Barnhart, M. M., Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 131-147.

Barrons, R., Tassone, D. (2008). Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clinical therapeutics*, 30(3), 453-468.

Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Dong X, Wang Y, Zhang H (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21:695-7

Baron, F., Nau, F., Guérin-Dubiard, C., Bonnassie, S., Gautier, M., Andrews, S. C., Jan, S. (2016). Egg white versus Salmonella Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food microbiology*, 53, 82-93.

Bäumler, A. J., Heffron, F. (1995). Identification and sequence analysis of IpfABCDE, a putative fimbrial operon of Salmonella typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 177(8), 2087-2097.

Morris Jr, J. G., Hoffmann, S., Batz, B. (2011). Ranking the risks: the 10 pathogen-food combinations with the greatest burden on public health.

Bechet, M., Blondeau, R. (2003). Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 1072-1078.

Beech, I. B., Sunner, J. (2004). Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current opinion in Biotechnology*, 15(3), 181-186.

Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Pavunc, A. L., Habjanič, K., Šušković, J. (2011). Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(1), 43-53.

Bellon-Fontaine, M. N., Rault, J., Van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 7(1-2), 47-53.

Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Bacterial Biofilms*, 249-289. Springer, Berlin, Heidelberg.

Beshiru, A., Igbinosa, E. O. (2018). Characterization of extracellular virulence properties and biofilm-formation capacity of *Vibrio* species recovered from ready-to-eat (RTE) shrimps. *Microbial pathogenesis*, 119, 93-102.

Bibiloni, R., Pérez, P. F., Garrote, G. L., Disalvo, E. A., De Antoni, G. L. (2001). [33] Surface characterization and adhesive properties of bifidobacteria. *Methods in enzymology*, 336, 411-427. Academic Press.

Bhowmick, P. P., Devegowda, D., Ruwandeepika, H. D., Fuchs, T. M., Srikumar, S., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2011). gcpA (stm1987) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in both high and low nutrient medium. *Microbial pathogenesis*, 50(2), 114-122.

Bodor AM, Jansch L, Wissing J, Wagner-Dobler I. (2011). The luxS mutation causes loosely-bound biofilms in *Shewanella oneidensis*. *BMC Res Notes*, 4:180.

Bohinc, K., Oder, M., Fink, R., Torkar, K. G., Dražić, G., Raspor, P. (2017). Factors Affecting Microbial Adhesion. *Adhesion in Pharmaceutical, Biomedical and Dental Fields*, 167-184.

- Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H., Römling, U. (2005). Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *Journal of Medical Microbiology*, 54(12), 1171-1182.
- Bolla, P. A., Abraham, A. G., Perez, P. F., Serradell, M. (2016). Kefir-isolated bacteria and yeasts inhibit *Shigella flexneri* invasion and modulate pro-inflammatory response on intestinal epithelial cells. *Beneficial microbes*, 7(1), 103-110.
- Boles, B. R., Thoendel, M., Singh, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular microbiology*, 57(5), 1210-1223.
- Boot, H. J., Pouwels, P. H. (1996). Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Molecular microbiology*, 21(6), 1117-1123.
- Boris, S., Suárez, J. E., Vázquez, F., Barbés, C. (1998). Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and immunity*, 66(5), 1985-1989.
- Botes, M., Loos, B., van Reenen, C. A., Dicks, L. M. (2008). Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Archives of microbiology*, 190(5), 573-584.
- Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco, V. (2003). The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine,". *The American journal of clinical nutrition*, 78(4), 675-683.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), 320.
- Bremer, P. J., Fillery, S., McQuillan, A. J. (2006). Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 254–262.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Fontaine-Aupart, M. P. (2008). Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(7), 2135-2143.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.

Brokke P, Dankert J, Carballo J, Feijen J. (1991). Adherence of coagulase-negative staphylococci onto polyethylene catheters in vitro and in vivo: a study on the influence of various plasma proteins. *J Biomater Appl*; 5:204-226.

Cadieux, P. A., Burton, J., Devillard, E., Reid, G. (2009). Lactobacillus by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic Escherichia coli. *J Physiol Pharmacol*, 60(Suppl 6), 13-18.

Caffer, M. I., Pichel, M. (2006). Evolución de la salmonelosis y brotes hospitalarios por Salmonella spp. en los últimos 15 años. En Temas de zoonosis III, Cacchione RA, Durlach R, Larghi OP, Martino P (eds.). Asociación Argentina de Zoonosis. Bs. As., Argentina, 209-215.

Caffer M. I., Terragno R., Binsztein N. (2008). Manual de procedimientos. Diagnóstico y caracterización de Salmonella spp. Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina, pp. 42-56.

Camargo, T. M., Stipp, R. N., Alves, L. A., Harth-Chu, E. N., Höfling, J. F., Mattos-Graner, R. O. (2018). Novel two-component system of Streptococcus sanguinis affecting functions associated with viability in saliva and biofilm formation. *Infection and immunity*, 86(4), e00942-17.

Canzi, E., Guglielmetti, S., Mora, D., Tamagnini, I., Parini, C. (2005). Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 88(3-4), 207-219.

Canzi, E., Guglielmetti, S., Mora, D., Tamagnini, I., Parini, C. (2005). Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 88(3-4), 207-219.

Carasi P, Ambrosio NM, De Antoni GL, Bressollier P, Urdaci MC, de Serradell ML. (2014). Adhesion properties of potentially probiotic Lactobacillus kefir to gastrointestinal mucus. *J Dairy Research*, 81:16-23.

Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Romanin, D. E., Serradell, M. A., Urdaci, M. C. (2015). Impact of kefir derived Lactobacillus kefir on the mucosal immune response and gut microbiota. *Journal of immunology research*, 2015.

Cardoso, A. L. S. P., Tessari, E. N. C., Castro, A. G. M., Kanashiro, A. M. I., Gama, N. M. S. Q. (2001). Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descalsvado. *Arq. Inst. Bio.* 68, 19-22

Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises. *International journal of food microbiology*, 145(1), 1-8.

Carrasco, E., Morales-Rueda, A., García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: a review. *Food Research International*, 45(2), 545-556.

- Castelijm, G. A., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., Abee, T. (2012). Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling*, 28(1), 51-63.
- Cepeda, A., Franco, C. M. (2017). Effect of Food Residues in Biofilm Formation on Stainless Steel and Polystyrene Surfaces by *Salmonella enterica* Strains Isolated from Poultry Houses. *Foods*, 6(12), 106.
- Ceresa C, Tessarolo F, Caola I, Nollo G, Cavallo M, Rinaldi M, Fracchia L. (2015). Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *Journal Appl Microbiol*, 118(5):1116–1125.
- Chapman, J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International biodeterioration and biodegradation*, 51(4), 271-276.
- Chapman, C., Gibson, G., Rowland, I. (2014). Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and in vitro adhesion to bladder cells by urinary tract. *Anaerobe*, 27, 71-76.
- Characklis, W. G., Marshall, K. C. (1990). *Biofilms*.341
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied Environ Microbiol* 68, 728– 737.
- Chen X, Tian F, Liu X, Zhao J, Zhang H, Zhang H, Chen W. (2010). In vitro screening of lactobacilli with antagonistic activity against *Helicobacter pylori* from traditionally fermented foods. *Journal Dairy Science*, 93:5627-5634
- Chia, T.W. R., Fegan, N., McMeekin, T. A., Dykes, G. A. (2008). *Salmonella* Sofia differs from other poultry-associated *Salmonella* serovars with respect to cell surface hydrophobicity. *Journal of food protection*, 71(12), 2421-2428.
- Chia T.W.R., Goulter RM, McMeekin T, Dykes GA, Fegan N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26(8):853-859.
- Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
- Chousalkar, K., Gole, VC. (2016). Salmonellosis adquirida de aves de corral. Opinión actual en enfermedades infecciosas, 29(5), 514-519.
- Christopher, A. B., Arndt, A., Cugini, C., Davey, M. E. (2010). A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development. *Microbiology*, 156(11), 3469-3477.

- Chuah, L. O., Syuhada, A. K. S., Suhaimi, I. M., Hanim, T. F., Rusul, G. (2018). Genetic relatedness, antimicrobial resistance and biofilm formation of Salmonella isolated from naturally contaminated poultry and their processing environment in northern Malaysia. *Food research international*, 105, 743-751.
- Ciandrini, E., Campana, R., Baffone, W. (2017). Live and heat-killed Lactobacillus spp. interfere with Streptococcus mutans and Streptococcus oralis during biofilm development on titanium surface. *Archives of oral biology*, 78, 48-57.
- Ćirković, I., Vlahovic, M. S., Stepanovic, S. (2007). Influence of organic and inorganic acids on biofilm formation by Salmonella spp.: R2111. *Clinical Microbiology & Infection*, 13, S610-S611.
- Clavijo, R. I., Loui, C., Andersen, G. L., Riley, L. W., Lu, S. (2006). Identification of genes associated with survival of Salmonella enterica serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Applied Environmental Microbiology*, 72(2), 1055-1064.
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 1641.
- Costerton, J. W. (2007). The biofilm primer (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Collado, M.C., Meriluoto, J. Salminen, S. (2007). In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, 40, 629–636.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065-1073.
- Collinson S, Doig P, Doran J, Clouthier S, Trust T, Kay W. (1993). Thin, aggregative fimbriae mediate binding of Salmonella enteritidis to fibronectin. *Journal Bacteriology* 175:12–18
- Conway, A. (2016a). World poultry meat market growth modest in 2015–2016. *Poultry Trends*, 6–12.
- Conway, A. (2016b). Egg production breaks record 70-million-metric-ton mark in 2015. *Poultry Trends*, 32–38.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Crawford, R. W., Gibson, D. L., Kay, W. W. Gunn, J. S. (2008). Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for Salmonella biofilm formation on gallstone surfaces. *Infection and immunity*, 76(11), 5341-5349.
- Dantas, S. T., Rossi, B. F., Bonsaglia, E. C., Castilho, I. G., Hernandes, R. T., Fernandes, A., Rall, V. L. (2018). Cross-Contamination and biofilm formation by Salmonella enterica

- serovar Enteritidis on various cutting boards. *Foodborne pathogens and disease*, 15(2), 81-85.
- Davies, R., Breslin, M. 2003. Observations on Salmonella contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Veterinary Record*, 152, 283–287.
- D'Aoust, J. Y. (1991). Pathogenicity of foodborne Salmonella. *International journal of food microbiology*, 12(1), 17-40. J. Wain. 2001. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Current Opinion Infection Dis.* 14:573–578.
- D'Aoust, J. Y. (1991). Pathogenicity of foodborne Salmonella. *International journal of food microbiology*, 12(1), 17-40.
- D'Aoust, J. Y., Maurer, J. (2007). Salmonella species. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition* (pp. 187-236). American Society of Microbiology.
- Dapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, Scarselli M, Minton NP, Serruto D, Unnikrishnan M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriology*, 195:545–555.
- Das, J., Mishra, D., Ray, P., Tripathy, P., Beuria, T., Singh, N., Suar, M. (2013). In vitro evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Gut Pathogens*, 5, 1-11.
- Davies, R., Breslin, M. (2003). Observations on Salmonella contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Veterinary Record*, 152(10), 283-287.
- De Oliveira, D. C. V., Fernandes Junior, A., Kaneno, R., Silva, M. G., Araujo Junior, 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*, 11(6), 478-483.
- De Reu, K., Grijspeerd, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *International journal of food microbiology*, 112(3), 253-260.
- de Rezende, C. E., Anriany, Y., Carr, L. E., Joseph, S. W., Weiner, R. M. (2005). Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11), 7345-7351.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol.* 31:438-442.
- Dertli, E., Mayer, M. J., Narbad, A. (2015). Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* F19785. *BMC microbiology*, 15(1), 8.

- 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*, 31, 173–180
- Dillon, Jasmine K., John A. Fuerst, Alan C. Hayward, Gordon H G Davis. (1986). "A Comparison of Five Methods for Assaying Bacterial Hydrophobicity." *Journal of Microbiological Methods*, 6(1): 13–19.
- Dimakopoulou-Papazoglou, D., Lianou, A., Koutsoumanis, K. P. (2016). Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. *Food microbiology*, 53, 76-81.
- Ding, W. K., Shah, N. P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of food science*, 72(9), M446-M450.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(6), 2950-2958.
- Donlan, R. M., Piede, J. A., Heyes, C. D., Sanii, L., Murga, R., Edmonds, P., El-Sayed, M. A. (2004). Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(8), 4980-4988.
- Donlan RM, Costerton JW. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15:167e193.
- Donlan, R. M. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in microbiology*, 17(2), 66-72.
- Dookeran, M. M., Baccus-Taylor, G. S., Akingbala, J. O., Tameru, B., Lammerding, A. M. (2012). Transmission of *Salmonella* on broiler chickens and carcasses from production to retail in Trinidad and Tobago. *Journal of Agriculture and Biodiversity Research*, 1, 78–84.
- Dougnon, Tamègnon Victorien (2017). "Pathogenicity, Epidemiology and Virulence Factors of *Salmonella* Species: A Review." *Notulae Scientia Biologicae* 9(4): 460.
- Dosti, B., GUZEL-SEYDIM, Z. E. Y. N. E. P., Greene, A. K. (2005). Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *International journal of dairy technology*, 58(1), 19-24.
- Duguid, J.P. (1959). Fimbriae and Adhesive Properties in *Klebsiella* Strains. *Microbiology*, 21(1): p. 271-286.
- Duguid, J. P., Anderson, E. S., Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *The Journal of Pathology*, 92(1), 107-137.
- Duguid, J. P., Anderson, E. S., Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 92, 107–138.
- Duncan-Hewitt W. (1990). Microbial cell surface hydrophobicity. *American Society of Microbiology*. 39.

- Dunne, W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 155–166.
- Edwards, R. A., Olsen, G. J., Maloy, S. R. (2002). Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends in microbiology*, 10(2), 94-99.
- Ekmekci, H., Aslim, B., Ozturk, S. (2009). Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with Escherichia coli. *Microbiology and immunology*, 53(2), 59-65.
- Elsinghorst, E. A. 1994. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods in enzymology*, 236, 405-420.
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., Lee, L. H. (2015). Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293.
- Estrada-Acosta, M., Jiménez, M., Chaidez, C., León-Félix, J., Castro-del Campo, N. (2014). Irrigation water quality and the benefits of implementing good agricultural practices during tomato (*Lycopersicon esculentum*) production. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(7), 4323–4330.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of Salmonella in broilers. *FSA Journal* 2011;9(7):2106.
- Falagas, M. E., Makris, G. C. (2009). Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *J. Hosp. Infect.* 71, 301–306.
- Farrell, D. (2013). The role of poultry in human nutrition. Poultry development review, 2–3. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Felek, S., Lawrenz, M. B., Krukonis, E. S. (2008). The Yersinia pestis autotransporter YapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation. *Microbiology*, 154(6), 1802-1812.
- Ferreira, C., Pereira, A. M., Melo, L. F., Simões, M. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. Current Research, Technology and Education. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 845-854.
- Flemming, H. C., Neu, T. R., Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of bacteriology*, 189(22), 7945-7947.
- Flemming H C, Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8(9): 623-633.
- Folsom, J. P., Siragusa, G. R., Frank, J. F. (2006). Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of Listeria monocytogenes. *Journal of food protection*, 69(4), 826-834.

- Fonseca, B., Silva, P., Silva, A. C. A., Dantas, N., Paula, A., Olivieri, O., Goulart, L. (2019). Nanocomposite of Ag-doped ZnO and Ag<sub>2</sub>O nanocrystals as a preventive measure to control biofilm formation in eggshell and *Salmonella* spp. entry into eggs. *Frontiers in microbiology*, 10, 217.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei* rhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, 152(2), 167-173.
- Forsythe, S. J., Hayes, P. R. (1998). Cleaning and disinfection: methods. In Food hygiene, microbiology and HACCP (pp. 327-363). Springer, Boston, MA.
- Forsyth S J. (2010). The Microbiology of Safe Food. 2<sup>nd</sup> ed; Hardcover, Wiley-Blackwell; p. 38-66.
- Fracchia, L., Cavallo, M., Allegrone, G., Martinotti, M. G. (2010). A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2, 827-837.
- Frickmann, H., Klenk, C., Warnke, P., Redanz, S., Podbielski, A. (2018). Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of staphylococci. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 8(4), 119-127.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.-H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* 30, 1749–1758.
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C., Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in microbiology*, 5, 391.
- Gamba, R. R., Ni Colo, C., Correa, M., Astoreca, A. L., Alconada Magliano, T. M., De Antoni, G., León Peláez, Á. (2015). Antifungal activity against *Aspergillus parasiticus* of supernatants from whey permeates fermented with kefir grains.
- Gandhi, M., Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International journal of food microbiology*, 113(1), 1-15.
- Gangoiti, M. V., Puertas, A. I., Hamet, M. F., Peruzzo, P. J., Llamas, M. G., Medrano, M., Abraham, A. G. (2017). *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An  $\alpha$ -glucan producing-strain isolated from kefir grains. *Carbohydrate polymers*, 170, 52-59.
- García, B., Latasa, C., Solano, C., Portillo, F. G. D., Gamazo, C., Lasa, I. (2004). Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular microbiology*, 54(1), 264-277.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of dairy research*, 68(4), 639-652.

- Garrote, G. L., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A. G., Pérez, P. F., Semorile, L., De Antoni, G. L. (2004). Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 222-230.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. (2010). Microbial Interactions in Kefir: A natural probiotic drink. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, 327.
- Gast, R. K., C. W. Beard, (1990). Production of Salmonella enteritidis contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Dis.* 34:438–446.
- Gast RK. (2008). Salmonella infections-paratyphoid infections. Disease of Poultry. Saif YM, ed. Ames: Blackwell Publishing, pp. 636–665.
- Gast, R. (2013). Paratyphoid infections. D. E. Swayne (Ed.). Diseases of poultry (pp. 673–713). Ames Iowa: Wiley-Blackwell Publishing 718–733.
- Geertsema-Doornbusch, G. I., Van der Mei, H. C., Busscher, H. J. (1993). Microbial cell surface hydrophobicity the involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). *Journal of Microbiological Methods*, 18(1), 61-68.
- Gerlach RG, Claudio N, Rohde M, Jäckel D, Wagner C, Hensel M. (2008). Cooperation of Salmonella pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol* 10:2364–2376.
- Gerstel, U., Römling, U. (2003). The csgD promoter, a control unit for biofilm formation in Salmonella typhimurium. *Research in microbiology*, 154(10), 659-667.
- Giaouris, E., Chorianopoulos N., Nychas G. J. (2005). Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by Salmonella enterica enteritidis PT4 on stainless steel surfaces, as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *J. Food Prot.* 68:2149–2154 *J. Microbiol. Meth.* 18 61.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Mørretrø, T., Langsrud, S., Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6, 841.
- Gibson H., Taylor J.H., Hall K.E., Holah J.T. (1995). Biofilms and their detection in the food industry. R & D Report no. 1. Chipping Campden, UK: Campden and Chorleywood Food Research Association.
- Gibson, D. L., White, A. P., Snyder, S. D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P. (2006). Salmonella produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7722–7730.
- Gkana, Eleni N. (2017). Biofilm Formation by Salmonella Typhimurium and Staphylococcus Aureus on Stainless Steel under Either Mono- or Dual-Species Multi-Strain Conditions and Resistance of Sessile Communities to Sub-Lethal Chemical Disinfection. *Food Control*, 73: 838–46.

Goh YJ, Klaenhammer TR. (2010). Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiology*, 76:5005-5012.

Goldstone RJ, Popat R, Fletcher MP, Cruz SA, Diggle SP. (2012). Quorum sensing and social interactions in microbial biofilms, Current research and applications, Caister academic press, Norfolk, UK;1-24.

Gole, V. C., Chousalkar, K. K., Roberts, J. R., Sexton, M., May, D., Tan, J., Kiermeier, A. (2014a). Effect of egg washing and correlation between eggshell characteristics and egg penetration by various *Salmonella Typhimurium* strains. *PLoS one*, 9(3), e90987.

Gole, V. C., Roberts, J. R., Sexton, M., May, D., Kiermeier, A., Chousalkar, K. K. (2014b). Effect of egg washing and correlation between cuticle and egg penetration by various *Salmonella* strains. *International journal of food microbiology*, 182, 18-25.

Goller, C. C., Romeo, T. (2008). Environmental influences on biofilm development. In *Bacterial Biofilms* (pp. 37-66). Springer, Berlin, Heidelberg.

Golowczyc MA. (2007). Tesis doctoral: Caracterización taxonómica, probiótica y tecnológica de lactobacilos aislados de kefir.

Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying s-layer protein against *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 264-273.

Golowczyc MA, Gugliada MJ, Hollmann A, Delfederico L, Garrote GL, Abraham AG, Semorile L, De Antoni GL. (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research*, 75, 211-217.

Golowczyc M, Mobili P, Garrote GL, Serradell MA, Abraham AG, De Antoni GL. (2009). Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *Journal Dairy Research*; 76:111e6

Gómez, NC, Ramiro, JM, Quecan, BX, de Melo Franco, BD. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 863.

González, L. J., Martínez, F. N., Rossi, L., Tornese, M., Troncoso, A. (2010). Enfermedades transmitidas por los alimentos: Análisis del riesgo microbiológico. *Revista chilena de infectología*, 27(6), 513-524.

Gorski, L., Palumbo, J.D., Mandrell, R.E. (2003). Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Appl Environ Microbiology*, 69, 258-266.

- Gram L., Bagge-Ravn D., NgY. Y., Gyomoe P., Vogel B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 1165–1171.
- Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K., Römling, U. (2010). Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of bacteriology*, 192(2), 456-466.
- Guan, J., Grenier, C., Brooks, B. W. (2006). In vitro study of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* definitive type 104: survival in egg albumen and penetration through the vitelline membrane. *Poultry science*, 85(9), 1678-1681.
- Guglielmotti, D. M., Marcó, M. B., Golowczyc, M., Reinheimer, J. A., Quiberoni, A. D. L. (2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal*, 17(8), 916-925.
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 825.
- Hadi, R., Vickery, K., Deva, A., Charlton, T. (2010). Biofilm removal by medical device cleaners: comparison of two bioreactor detection assays. *Journal of Hospital Infection* 74, 160–167.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7), 1034–1043.
- Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A, Normark S. (1995). Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiology*, 18:661–70.
- Hancock, V., Witsø, I. L., Klemm, P. (2011). Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(7), 570-576.
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 249-273.
- Hayward, R. D., V. Koronakis. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J.* 18:4926–4934.
- He H., Cooper J.N., Mishra A., Raskin D.M. (2012). Stringent response regulation of biofilm formation in *Vibrio cholera*. *J. Bacteriol.*, 194, 2962-2972.
- Herald, P.J., Zottola, E.A. (1988). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal Food Science*, 53, 1549– 1552.

Hersh, D., D. M. Monack, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow, A. Zychlinsky. (1999). The Salmonella invasion SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2396–2401.

Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiology*, 8, 15–25.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Calder, P. C. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506.

Hincke, M. T., Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A. B. Rodríguez-Navarro. (2012). The eggshell: Structure, composition and mineralization. *Front. Biosci. Special Edition on Biomineralization* 17:1266–1280.

Hirakawa H., Inazumi Y., Masaki T., Hirata T., Yamaguchi A. (2005). Indole induces the expression of multidrug exporter genes in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.*, 55, 1113-1126.

Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171.

Honma, K., Inagaki, S., Okuda, K., Kuramitsu, H. K., Sharma, A. (2007). Role of a Tannerella forsythia exopolysaccharide synthesis operon in biofilm development. *Microbial pathogenesis*, 42(4), 156-166.

Hood, S.K., Zottola, E.A. (1995). Biofilms in food processing. *Food Control* 6, 9– 18.

House, D., Bishop, A., Parry, C., Dougan, G., Wain, J. (2001). Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Current opinion in infectious diseases*, 14(5), 573-578.

Howard, Z. R., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., Ricke, S. C. (2012). Salmonella Enteritidis in shell eggs: current issues and prospects for control. *Food Research International*, 45(2), 755-764.

Hugo, A. A., Kakisu, E., De Antoni, G. L., Pérez, P. F. (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic Escherichia coli in vitro. *Letters in applied microbiology*, 46(6), 613-619.

Hugo A, Pérez P, Añón MC, Speroni F. (2014). Incorporation of Lactobacillus delbrueckii subsp lactis (CIDCA 133) in cold-set gels made from high pressure-treated soybean proteins, *Food Hydrocolloids*. 37: 34-39

Hughenoltz, J. (2008). The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *International Dairy Journal*, 18(5), 466-475.

Hur, J., Jawale, C., & Lee, J. H. (2012). Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. *Food Research International*, 45(2), 819-830.

- Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Palva A, Korhonen TK. (2002). Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *Journal Bacteriology*, 184:3360–3367.
- Imen, B. S., Ridha, M., Mahjoub, A. (2012). Laboratory typing methods for diagnostic of *Salmonella* strains, the “old” organism that continued challenges. *Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen*, 349-372.
- Isberg, R. R., Van Nhieu, G. T. (1994). Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends in microbiology*, 2(1), 10-14.
- Iturriaga, M. H., Tamplin, M. L., Escartin, E. F. (2007). Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature. *Journal of food protection*, 70(1), 30-34.
- Jacobs, A., Chenia, H. Y. (2009). Biofilm-forming capacity, surface hydrophobicity and aggregation characteristics of *Myroides odoratus* isolated from South African *Oreochromis mossambicus* fish. *Journal of applied microbiology*, 107(6), 1957-1966.
- Jacobs, A., H. Chenia, Y. (2010). Biofilm-forming capacity, surface hydrophobicity and aggregation characteristics of *Myroides odoratus* isolated from South African *Oreochromis mossambicus* fish. *Journal Applied Microbiology*, 107:1957-1966.
- Jain, S., Chen, J. (2007). Attachment and biofilm formation by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. *Journal of food protection*, 70(11), 2473-2479.
- James MJ, Martin JL, David AG. (2005). *Modern Food Microbiology*, Springer, New York, 334-339.
- James, K. M., MacDonald, K. W., Chanyi, R. M., Cadieux, P. A., Burton, J. P. (2016). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and modulation of gene expression by probiotic cells and supernatant. *Journal of medical microbiology*, 65(4), 328-336.
- Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, RoÈmling U, Belova LM. (2007). Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology*, 7:70.
- Jonchère, V., Réhault-Godbert, S., Hennequet-Antier, C., Cabau, C., Sibut, V., Cogburn, L. A., Gautron, J. (2010). Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg. *BMC genomics*, 11(1), 57.
- Jones, B. D. (1997). Host responses to pathogenic *Salmonella* infection. *Genes & development*, 11(6), 679-687.
- Jones, S.E., Versalovic, J. (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 9, 35.

- Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal Food Microbiology*, 64(3):367- 372.
- Kaiser, M. G., Lamont, S. J. (2001). Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure. *Poultry science*, 80(8), 1105-1108.
- Kapil C., R Gast, F Martelli, V Pande. (2017). "Critical Reviews in Microbiology Review of Egg-Related Salmonellosis and Reduction Strategies in United States, Australia, United Kingdom and New Zealand." *Critical Reviews in Microbiology*, 0(0): 1–14.
- Kakisu, E. J., Abraham, A. G., Perez, P. F., De Antoni, G. L. (2007). Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2613-2616.
- Kakisu, E., Irigoyen, A., Torre, P., De Antoni, G. L., Abraham, A. G. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 456-463.
- Kakisu, E., Bolla, P., Abraham, A. G., De Urraza, P., De Antoni, G. L. (2013). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir: Protection of cultured Hep-2 cells against *Shigella* invasion. *International dairy journal*, 33(1), 22-26.
- Kaplan, J. B., Rangunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(7), 2633-2636.
- Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hansen, A. H., Lassen, J., Hirn, J., Helmuth, R. (1990). Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(12), 2597-2601.
- Karatan, E., Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310-347.
- Karunakaran, E., Biggs, C. A. (2011). Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(4), 1161-1175.
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., Lewis, K. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS microbiology letters*, 230(1), 13-18.
- Kheradmand E, Rafii F, Yazdi MH, Sepahi AA, Shahverdi AR, Oveisi MR. (2014). The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans*. *Daru* 22:48.

Khiralla, G. M., El-Deeb, B. A. (2015). Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1001-1007.

Kim, J. M., Eckmann, L., Savidge, T. C., Lowe, D. C., Witthöft, T., Kagnoff, M. F. (1998). Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *The Journal of clinical investigation*, 102(10), 1815-1823.

Kim, Y., Kim, S. H. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(2), 324-329.

Kingsley, R. A., Santos, R. L., Keestra, A. M., Adams, L. G., Bäumlner, A. J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Molecular microbiology*, 43(4), 895-905.

Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, Döpfer D, Fazil A, Fischer-Walker CL, Hald T, Hall AJ, Keddy KH, Lake RJ, Lanata CF, Torgerson PR, Havelaar AH, Angulo FJ (2015). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases. *PLoS Medicine* 12(12):1–21.

Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jorgensen, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48:1511–1524.

Klotz SA. (1990). Role of hydrophobic interaction in microbial adhesion to plastic used in medical devices. *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. 107–136.

Knowles, J. R., Roller, S., Murray, D. B., Naidu, A. S. (2005). Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied Environmental Microbiology*, 71(2), 797-803.

Kocaman, B., Esenbuga, N., Yildiz, A., Laçin, E., Macit, M. (2006). Effect of environmental conditions in poultry houses on the performance of laying hens. *International Journal of Poultry Science*, 5(1), 26-30.

Korhonen TK, Lounatmaa K, Ranta H, Kuusi N. (1980). Characterization of type 1 pili of *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal Bacteriology*, 144:800–805.

Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SC, Singh SK, Valence F. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci*;105:19474e9.

Kotzamanidis, C., Kourelis, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., Yiangou, M. (2010). Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory

activity of presumptive probiotic Lactobacillus strains. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 154e163

Kos, B. V. Z. E., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.

Kragh, K. N., Hutchison, J. B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A. E., Irie, Y., Bjarnsholt, T. (2016). Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *MBio*, 7(2), e00237-16.

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J. Biosci. Bioeng.*, 106, 381–386.

Kumar, C. G., Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology*, 42(1-2), 9-27.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.

Lahtinen, S.J., Knoblock, K., Drakoularakou, A., Jacob, M., Stowell, J., Gibson, G.R., Ouwehand, A.C. (2010). Effect of molecule branching and glycosidic linkage on the degradation of polydextrose by gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74: 2016-2021

Lang C, Böttner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Reindl A, Pompejus M, Tanzer JM. (2010). Specific lactobacillus/mutans streptococcus co-aggregation. *Journal Dental Research*, 89:175–179.

Larimer C., E. Winder, R. Jeters, M. Prowant, I. Nettleship, R.S. Addleman and G.T. Bonheyo. (2016). A method for rapid quantitative assessment of biofilms with biomolecular staining and image analysis. *Anal. Bioanal. Chem*, 408: 999–1008.

Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penades JR, Lasa I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 58:1322–1339

Lebeer S, Verhoeven TL, Perea Velez M, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain Lactobacillus rhamnosus GG. *Applied Environmental Microbiology*;73(21):6768–75

Leccese Terraf, M. C., Mendoza, L. M., Juárez Tomás, M. S., Silva, C., Nader-Macías, M. E. F. (2014). Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli. *Journal of applied microbiology*, 117(6), 1761-1772.

Lembre, P., Lorentz, C., Di Martino, P., Di Martino, P. (2012). Exopolysaccharides of the biofilm matrix: A complex biophysical world. INTECH Open Access Publisher.

- Ledeboer NA, Frye JG, McClelland M, Jones BD. (2006). Salmonella enterica serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect Immunology*, 74(6):3156-3169.
- Lewus, C. B., Kaiser, A. L. A. N., Montville, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied Environmental Microbiology*, 57(6), 1683-1688.
- Li H, Liu L, Zhang S, Cui W, Lv J. (2012). Identification of antifungal compounds produced by Lactobacillus casei AST18. *Curr Microbiol* 65(2):156–161.
- Li, S., Shah, N. P. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from Pleurotus eryngii and Streptococcus thermophilus ASCC 1275. *Food chemistry*, 165, 262-270.
- Li, Q., Liu, X., Zhou, J. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food, 3(February), 84–92.
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of Salmonella enterica under various environmental conditions. *International Journal Food Microbiology*, 160, 171–178.
- Londero, A., Iraporda, C., Garrote, G. L., Abraham, A. G. (2015). Cheese whey fermented with kefir micro-organisms: Antagonism against Salmonella and immunomodulatory capacity. *International journal of dairy technology*, 68(1), 118-126.
- Lou, Y., Lin, L., Xu, D., Zhao, S., Yang, C., Liu, J., Yang, K. (2016). Antibacterial ability of a novel Cu-bearing 2205 duplex stainless steel against Pseudomonas aeruginosa biofilm in artificial seawater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, 199-205.
- Lublin, A., Maler, I., Mechani, S., Pinto, R., Sela-Saldinger, S. (2015). Survival of Salmonella enterica serovar infantis on and within stored table eggs. *Journal of food protection*, 78(2), 287-292.
- Ma Q, Zhang G, Wood TK. (2011). Escherichia coli BdcA controls biofilm dispersal in Pseudomonas aeruginosa and Rhizobium meliloti. *BMC Res Notes* 4:447. 31.
- MacKenzie, K. D., Palmer, M. B., Köster, W. L., White, A. P. (2017). Examining the link between biofilm formation and the ability of pathogenic Salmonella strains to colonize multiple host species. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 138.
- Maeyama, R., Mizunoe, Y., Anderson, J. M., Tanaka, M., Matsuda, T. (2004). Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed Escherichia coli and fluoro-stained exopolysaccharide. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 70(2), 274-282.

Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. (2010). International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness S. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. *Clinical Infect Dis.* 50:882–889.

Mahmood, H. Y. (2015) Isolation, characterization and anti-bacterial activity of lecithin from egg yolk. *Bas.J.Vet.Res.*14:2, 61-98

Malamud, M., Carasi, P., Bronsoms, S., Trejo, S. A., Serradell, M. de los A. (2016). Lactobacillus kefir shows inter-strain variations in the amino acid sequence of the S-layer proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(4), 515–530.

Malcova, M., Hradecka, H., Karpiskova, R., Rychlik, I. (2008). Biofilm formation in field strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium: identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Veterinary microbiology*, 129(3-4), 360-366.

Maldonado, N. C., Silva de Ruiz, C., Cecilia, M., & Nader-Macias, M. E. (2007). A simple technique to detect Klebsiella biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of Lactobacillus fermentum CRL 1058 whole cells and products. *Communicating current research and educational topics and Trends in Applied Microbiology*, 52-59.

Malik, S., Petrova, M.I., Imholz, N.C.E., Verhoeven, T.L.A., Noppen, S., Van Damme, E.J.M., Liekens, S., Balzarini, J., Schols, D., Vanderleyden, J. Lebeer, S. (2016). High mannose-specific lectin Msl mediates key interactions of the vaginal Lactobacillus plantarum isolate CMPG5300. *Scientific Reports* 6: 37339.

Mancini, S. (2013). Estudio retrospectivo de casos y brotes de Salmonelosis ocurridos en la ciudad de Viedma, período 2000 – 2010. Tesina para grado de especialista en Salud Pública Veterinaria. Universidad Nacional de la Pampa.

Marianelli, C., Cifani, N., Pasquali, P. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in microbiology*, 161(8), 673-680.

Marin ML, Benito Y, Pin C, Fernandez MF, Garcia ML, Selgas MD, Casas C. (1997). Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Letters Applied Microbiology*, 24:14–18

Marin, C., Hernandez, A., Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of Salmonella strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 88, 424–431.

Marion-Ferey, K., Pasmore, M., Stoodley, P., Wilson, S., Husson, G. P., Costerton, J. W. (2003). Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *Journal of Hospital Infection*, 53(1), 64-71.

Marshall, K.C. (1976). *Interfaces and Microbial Ecology*, Harvard University Press, Cambridge.

Marshall, K. C. (1985). Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In *Bacterial adhesion* (pp. 133-161). Springer, Boston, MA.

Marsh, P. D. (2010). Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Journal of dentistry*, 38, S11-S15.

Martínez Tristán, A. (2011). Biosorción del colorante congo en sistemas en lote utilizando biomasa de *Chlorella sp* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Mastromarino, P., Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V., Matteuzzi, D. (2002). Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5), 884-893.

Matsubara, V. H., Wang, Y., Bandara, H. M. H. N., Mayer, M. P. A., Samaranayake, L. P. (2016). Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(14), 6415-6426.

Maukonen J, Mättö J, Wirtanen G, Raaska L, Mattila-Sandholm T, Saarela M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal Ind Microbiol Biotechnol* 30:327–356

Mc Dermott, W. (1958). Microbial persistence. *The Yale journal of biology and medicine*, 30(4), 257.

McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39.

McMillan, A., Dell, M., Zellar, M. P., Cribby, S., Martz, S., Hong, E., Reid, G. (2011). Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(1), 58–64.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607.

Medrano, M., Pérez, P. F., Abraham, A. G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International journal of food microbiology*, 122(1-2), 1-7.

Medrano, M., Racedo, S. M., Rolny, I. S., Abraham, A. G., Pérez, P. F. (2011). Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5299-5304.

Medrano-Félix, J. A., Chaidez, C., Mena, K. D., del Socorro Soto-Galindo, M., & Castro-del Campo, N. (2018). Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* at the air-liquid interface in aquatic environments. *Environmental monitoring and assessment*, 190(4), 221.

Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E., Simões, M. (2016). The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Research International*, 86, 140-146.

Messens, W., Grijspeerdt, K., De Reu, K., De Ketelaere, B., Mertens, K., Bamelis, F., Herman, L. (2007). Eggshell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Food Protection*, 70(3), 623-628.

Meylan, S., Andrews, I. W., Collins, J. J. (2018). Targeting Antibiotic Tolerance, Pathogen by Pathogen. *Cell*, 172(6), 1228-1238.

Mireles, J. R., Toguchi, A., Harshey, R. M. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 183(20), 5848-5854.

Mittelman, M. W. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81, 2760–2764.

Misselwitz B, Kreibich SK, Rout S, Stecher B, Periaswamy B, Hardt WD. (2011). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium binds to HeLa cells via Fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking. *Infect Immun* 79(1):330- 341.

Mizan, M. F. R., Jahid, I. K., Ha, S. D. (2015). Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. *Food microbiology*, 49, 41-55.

Miyamoto, T., E. Baba, T. Tanaka, K. Sasai, T. Fukata, A. Arakawa, (1997). *Salmonella enteritidis* contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes. *Avian Dis.* 41:296–303  
Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS pathogens*, 4(11), e1000213.

Moltz, A. G., Martin, S. E. (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of food protection*, 68(1), 92-97.

Mobili, P (2008). Tesis doctoral: Caracterización de las proteínas de superficie (capa S) de *Lactobacillus kefir*.

Mobili, P., Gerbino, E., Tymczyszyn, E. E., Gómez-Zavaglia, A. (2010). S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol*, 22, 1224-1234.

Monack, D. M., B. Raupach, A. E. Hromockyj, S. Falkow. (1996). Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9833–9838.

Montville, T. J., Chen, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied microbiology and Biotechnology*, 50(5), 511-519.

Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Jorganes, F., Muñoz, R. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International journal of food microbiology*, 84(1), 117-123.

Munck, NSM, Njage, PMK, Litrup, E., Hald, T. (2018). Tendencias y fuentes en salmonelosis humana. En Informe anual sobre las zoonosis en Dinamarca 2017 (pp. 6-8). Universidad Técnica de Dinamarca.

Munoz, A., Dominguez-Gasca, N., Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, A. B. (2015). Importance of eggshell cuticle composition and maturity for avoiding trans-shell Salmonella contamination in chicken eggs. *Food Control*, 55, 31-38.

Muller, C., Busignies, V., Mazel, V., Forestier, C., Nivoliez, A., Tchoreloff, P. (2013). Mechanistic approach to stability studies as a tool for the optimization and development of new products based on *L. rhamnosus* Lcr35® in compliance with current regulations. *PLoS One*. 8, e79041.

Nácher-Vázquez, M., Iturria, I., Zarour, K., Mohedano, M. L., Aznar, R., Pardo, M. Á., López, P. (2017). Dextran production by *Lactobacillus sakei* MN1 coincides with reduced autoagglutination, biofilm formation and epithelial cell adhesion. *Carbohydrate polymers*, 168, 22-31.

Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Rodríguez-Cerrato, V., Ruiz, V., Ponte, M. C., Soriano, F. (2010). Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-l-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Hospital Infection*, 76(2), 165–170.

Neumann U., H. Khalaf, Rimpler. (1994). Quantitation of electrophoretically separated proteins in the submicrogram range by dye elution. *Electrophoresis* 15: 916–921.

Nguyen, H. D. N., Yang, Y. S., Yuk, H. G. (2014). Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 383–388.

Ni, N., Li, M., Wang, J., Wang, B. (2009). Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Medicinal research reviews*, 29(1), 65-124.

Nikitina, V. E., E. G. Ponomareva, S. A. Alen'kina, S. A. Konnova. (2001). The role of cell surface lectins in the aggregation of *Azospirilla*. *Microbiology*, 70:471-476.

Nikolic M, Jovic B, Kojic M, Topisirovic L. (2010). Surface properties of Lactobacillus and Leuconostoc isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Eur Food Res Technology*, 231:925-931.

Nocelli N, Bogino PC, Banchio E, Giordano W. (2016). Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of Rhizobia. *Materials*. 9:E418

Nuccio, S.P., A.J. Baumler. (2007). Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial Classification Goes Greek. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71(4): p. 551-575.

Ofec, J., E. Whitnack, E. H. Beachey. (1983). Hydrophobic interactions of group A streptococci with hexadecane droplets. *J. Bacteriol*. 154:139-145.

Ofek, I., Doyle, R. J. (1994). Principles of bacterial adhesion. In *Bacterial adhesion to cells and tissues* (pp. 1-15). Springer, Boston, MA.

Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K., Baba, E. (2001). Differences among six Salmonella serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian diseases*, 61-69.

Oliveira, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J., Oliveira, R. (2007). Adhesion of Salmonella Enteritidis to stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 318-323.

Olsen, J. E., Brown, D. J., Madsen, M., Bisgaard, M. (2003). Cross-contamination with Salmonella on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 826-835.

Olson, M., Ceri, H., Morck, D., Buret, A., Read, R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66, 86-92.

O'Toole, G. A., Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Molecular microbiology*, 30(2), 295-304.

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47), e2437

Ouali, F. A., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., Drider, D. (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International journal of food microbiology*, 191, 116-124.

Palmer, R. J., Stoodley, P. (2007). Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases.

- Pan, W. H., Li, P. L., Liu, Z. (2006). The correlation between surface hydrophobicity and adherence of Bifidobacterium strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 12(3), 148-152.
- Pande, V. V., McWhorter, A. R., Chousalkar, K. K. (2016). Salmonella enterica isolates from layer farm environments are able to form biofilm on eggshell surfaces. *Biofouling*, 32(7), 699-710.
- Park, J.-B., Jang, Y. J., Choi, B.-K., Kim, K.-K. Ko, Y. (2013). Treatment with various ultrasonic Scaler tips affects efficiency of brushing of SLA Titanium Discs. *Journal of Craniofacial Surgery* 24, e119–e123.
- Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 27-33.
- Parsek, M. R., Tolker-Nielsen, T. (2008). Pattern formation in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Current opinion in microbiology*, 11(6), 560-566.
- Patel, J., Sharma, M. (2010). Differences in attachment of Salmonella enterica serovars to cabbage and lettuce leaves. *International journal of food microbiology*, 139(1-2), 41-47.
- Paytubi S., Cansado C., Madrid C., Balsalobre C. (2017). Nutrient composition promotes switching between pellicle and bottom biofilm in Salmonella. *Frontiers in microbiology*, 8, 2160.
- Paz-Méndez, A., Lamas, A., Vázquez, B., Miranda, J., Cepeda, A., Franco, C. (2017). Effect of food residues in biofilm formation on stainless steel and polystyrene surfaces by Salmonella enterica strains isolated from poultry houses. *Foods*, 6(12), 106.
- Pedersen B, T., Elmerdahl Olsen, J., Bisgaard, M. (2008). Persistence of Salmonella Senftenberg in poultry production environments and investigation of its resistance to desiccation. *Avian Pathology*, 37(4), 421-427.
- Pembrey, R. S., Marshall, K. C., Schneider, R. P. (1999). Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties?. *Appl. Environ. Microbiology*, 65(7), 2877-2894.
- Perez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL. (1998) Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiology*, 64:21–26
- Pérez-Ibarreche, M. P., Castellano, P., Vignolo, G. (2014). Evaluation of anti-Listeria meat borne Lactobacillus for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat science*, 96(1), 295-303.
- Pérez-Ibarreche, M., Castellano, P., Leclercq, A., Vignolo, G. (2016). Control of Listeria monocytogenes biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing Lactobacillus sakei CRL1862. *FEMS microbiology letters*, 363(12), fnw118.

Petrova, M. I., Imholz, N. C., Verhoeven, T. L., Balzarini, J., Van Damme, E. J., Schols, D., Lebeer, S. (2016a). Lectin-like molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* biofilm formation. *PloS one*, 11(8), e0161337.

Petrova, M.I., Lievens, E., Verhoeven, T.L.A., Macklaim, J.M., Gloor, G., Schols, D., Vanderleyden, J., Reid, G. and Lebeer, S. (2016b). The lectin-like protein 1 in *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mediates tissue-specific adherence to vaginal epithelium and inhibits urogenital pathogens. *Scientific Reports*, 6: 37437.

Pham, T. K., Roy, S., Noirel, J., Douglas, I., Wright, P. C., Stafford, G. P. (2010). A quantitative proteomic analysis of biofilm adaptation by the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Proteomics*, 10(17), 3130-3141.

Pliszcak, D., Bourgeois, S., Bordes, C., Valour, J. P., Mazoyer, M. A., Orecchioni, A. M., Lantéri, P. (2011). Improvement of an encapsulation process for the preparation of pro-and prebiotics-loaded bioadhesive microparticles by using experimental design. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(1-2), 83-92.

Poimenidou, S., C. A. Belessi, E. D. Giaouris, A. S. Gounadaki, G. E. Nychas, P. N. Skandamis. (2009). *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. *Appl. Environ. Microbiology*, 75:7182–7188.

Polotsky, Y., Dragunsky, E., Khavkin, T. H. (1994). Morphologic Evaluation of the Pathogenesis of Bacterial Enteric Infections-Part I. *Critical reviews in microbiology*, 20(3), 161-184.

Pompermayer, D. M., Gaylarde, C. C. (2000). The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology*, 17(4), 361-365.

Posch, G., Pabst, M., Brecker, L., Altmann, F., Messner, P., Schäffer, C. (2011). Characterization and scope of S-layer protein O-glycosylation in *Tannerella forsythia*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38714-38724.

Prieto, C., Serra, D. O., Martina, P., Jacobs, M., Bosch, A., Yantorno, O. M. (2013). Evaluation of biofilm-forming capacity of *Moraxella bovis*, the primary causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary microbiology*, 166(3-4), 504-515.

Prigent-Combaret, C.; Brombacher, E.; Vidal, O.; Ambert, A.; Lejeune, P.; Landini, P.; Dorel, C. (2001). Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia coli* via Regulation of the *csgD* Gene. *J. Bacteriol.* 183, 7213–7223.

Prouty AM, Gunn JS. (2003). Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infect Immun* 71(12):7154-7158.

- Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Lee, H. Y., Tang, J. Y. H., Noorlis, A., Son, R. (2011). Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. *International Food Research Journal*, 18(1).
- Pulido-Landinez M., Sanchez-Ingunza R., Guard J., do Nascimento V.P. (2013). Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 57, 288-294.
- Raghunathan, D., Wells, T. J., Morris, F. C., Shaw, R. K., Bobat, S., Peters, S. E., Browning, D. F. (2011). SadA, a trimeric autotransporter from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, can promote biofilm formation and provides limited protection against infection. *Infection and immunity*, 79(11), 4342-4352.
- Rahman, M. M., Kim, W. S., Kumura, H., Shimazaki, K. I. (2008). Autoaggregation and surface hydrophobicity of bifidobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1593-1598.
- Ramadan, H. H., Sanclement, J. A., Thomas, J. G. (2005). Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 132(3), 414-417.
- Ramiah, K., van Reenen, C. A., Dicks, L. M. (2008). Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Research in microbiology*, 159(6), 470-475.
- Ramos, A. N., Gobbato, N., Rachid, M., Gonzalez, L., Yantorno, O., Valdez, J. C. (2010). Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Pseudomonas aeruginosa* culture supernatants on polymorphonuclear damage and inflammatory response. *International immunopharmacology*, 10(2), 247-251.
- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food microbiology*, 36(1), 22-29.
- Rasschaert, G., Houf, K., De Zutter, L. (2007). Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), 333-341.
- Rehman, T., Yin, L., LATIF, M. B., Chen, J., Wang, K., Geng, Y., Ouyang, P. (2019). Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins. *Microbial Pathogenesis*, 103748.
- Rendueles, O., Ghigo, J. M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, 36(5), 972-989.
- Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., Handley, P. S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in microbiology*, 11(2), 94-100.

- Rinaudi, L., F. Sorroche, A. Zorreguieta, W. Giordano. (2010). Analysis of mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *FEMS Microbiol Letters*, 302:15-21.
- Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Mayhew, T. M. (2010). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research*, 41(4), 451-467.
- Rishi, P., Bhagat, N. R., Thakur, R., Pathania, P. (2018). Tackling Salmonella Persister Cells by Antibiotic–Nisin Combination via Mannitol. *Indian Journal of Microbiology*, 1-5.
- Rodrigues, L., Van der Mei, H. C., Teixeira, J., Oliveira, R. (2004). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(7), 4408-4410.
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., Oliveira, R. (2006a). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(4), 609-618.
- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., van der Mei, H. C., Oliveira, R. (2006b). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49(1), 79-86.
- Rodríguez-Navarro, A. B., Domínguez-Gasca, N., Muñoz, A., Ortega-Huertas, M. (2013). Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. *Poultry Science*, 92(11), 3026-3035.
- Romanin, D., Serradell, M., Maciel, D. G., Lausada, N., Garrote, G. L., Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 102-108.
- Römling, U., Rohde, M. (1999). Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level, 180, 91–102.
- Römling U, Rohde M, Olse´n A, Normark S, Reinköster J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol*, 36(1):10–23
- Römling, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M., Tschäpe, H. (2003). Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(4), 273-285.
- Römling U. (2005). Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Science*, 62(11):1234-1246.
- Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J., Rose, V., Colin, P. (2000). Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. *Preventive Veterinary Medicine*, 44, 9–20.

- Rose, N., J. P. Mariani, P. Drouin, J. Y. Toux, V. Rose, P. Colin. (2003). A decision-support system for Salmonella in broiler-chicken flocks. *Prev. Vet. Med.* 5:27–42.
- Rose-Martel, M., Du, J., Hincke, M. T. (2012). Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. *Journal of Proteomics*, 75(9), 2697-2706.
- Rossoni, R. D., de Barros, P. P., de Alvarenga, J. A., Ribeiro, F. D. C., Velloso, M. D. S., Fuchs, B. B., Junqueira, J. C. (2018). Antifungal activity of clinical Lactobacillus strains against Candida albicans biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling*, 34(2), 212-225.
- Russell, S. M. (2012). Controlling Salmonella in poultry production and processing. CRC Press.
- Ryu EH, Yang EJ, Woo ER, Chang HC. (2014). Purification and characterization of antifungal compounds from Lactobacillus plantarum HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiol* 41:19–26.
- Sakakibara, J., Nagano, K., Murakami, Y., Higuchi, N., Nakamura, H., Shimosato, K., Yoshimura, F. (2007). Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of Tannerella forsythensis. *Microbiology*, 153(3), 866-876.
- Samberg Y, Meroz M. (1995). Application of disinfectants in poultry hatcheries. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 14:365–380.
- Samot, J., Lebreton, J., Badet, C. (2011). Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Anaerobe*, 17(2), 69-72
- Sanclement, J. A., Webster, P., Thomas, J., Ramadan, H. H. (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 115(4), 578-582.
- Sára, M., Sleytr, U. B. (2000). S-layer proteins. *Journal of bacteriology*, 182(4), 859-868.
- Sauer, K.; Camper, A.K.; Ehrlich, G.D.; Costerton, J.W.; Davies, D.G (2002). Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Bacteriology**, 184, 1140–1154
- Savadogo, A., Ouattara, A. C., Bassole, H. I., Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African journal of biotechnology*, 5(9).
- Schäfer, A., Harms, H., Zehnder, A. J. (1998). Bacterial accumulation at the air- water interface. *Environmental science & technology*, 32(23), 3704-3712.
- Scher, K., Romling, U., Yaron, S. (2005). Effect of heat, acidification, and chlorination on Salmonella enterica serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Appl. Environ. Microbiology*, 71(3), 1163-1168.

- Schneitz, C., Nuotio, L., Lounatma, K. (1993). Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *Journal of Applied Bacteriology*, 74(3), 290-294.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T. R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International journal of antimicrobial agents*, 17(6), 431-437.
- Schonewille, E., Windhorst, D., Bräuni, I. (2012). Biofilm building properties of *Salmonella* on the poultry farm. *International Poultry Production*, 20, 13–15.
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., Hengge, R. (2013). Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio*, 4(2), e00103-13.
- Servin, A. L., Coconnier, M. H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 741-754.
- Shah, D. H., Zhou, X., Addwebi, T., Davis, M. A., Orfe, L., Call, D. R. Besser, T. E. (2011). Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. *Microbiology*, 157(Pt 5), 1428.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of applied microbiology*, 121(2), 309-319.
- Shimotahira N, Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Yamada S, Fukutsuji K, Nagano K, Yoshimura F, Noguchi K, Komatsuzawa H. (2013). The surface layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial coaggregation. *Infect Immun*, 81:1198–1206.
- Shokri, D., Khorasgani, M. R., Mohkam, M., Fatemi, S. M., Ghasemi, Y., Taheri-Kafrani, A. (2018). The inhibition effect of lactobacilli against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(1), 34-42.
- Silva, E. A. Jr. (2005). *Manual de Controle Higiênico Sanitário em Serviços de Alimentação*. São Paulo: Varela
- Silva-Dias A., Miranda I., Branco J., Monteiro-Soares M., Pina-Vaz C., Rodrigues A. (2015). Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front. Microbiol.* 6:205.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology*, 53(4), 1123-1134.

- Singh, N., Sharma, C., Gulhane, R. D., Rokana, N., Singh, B. P., Puniya, A. K., Panwar, H. (2018). Inhibitory effects of lactobacilli of goat's milk origin against growth and biofilm formation by pathogens: an in vitro study. *Food bioscience*, 22, 129-138.
- Sintim, H. O., Smith, J. A., Wang, J., Nakayama, S., Yan, L. (2010). Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules. *Future medicinal chemistry*, 2(6), 1005-1035.
- Skandamis, P. N., Nychas, G. J. E. (2012). Quorum sensing in the context of food microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(16), 5473-5482.
- Sleytr, U. B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B. (2001). Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Progress in Surface Science*, 68(7-8), 231-278.
- Sleytr, U. B., Huber, C., Ilk, N., Pum, D., Schuster, B., Egelseer, E. M. (2007). S-layers as a tool kit for nanobiotechnological applications. *FEMS microbiology letters*, 267(2), 131-144.
- Smith, D. P., Musgrove, M. T. (2008). Effect of blood spots in table Egg albumen on Salmonella growth. *Poultry science*, 87(8), 1659-1661.
- Smit E, Oling F, Demel R, Martinez B, Pouwels PH. (2001). The S-layer protein of Lactobacillus acidophilus ATCC 4356: Identification and characterization of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *J Mol Biol.* 305:245-257.
- Simoës, M., Pereira, M. O., Machado, I., Simões, L. C., Vieira, M. J. (2006). Comparative antibacterial potential of selected aldehyde-based biocides and surfactants against planktonic *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(9), 741-749.
- Simoës, L. C., Simoës, M., Vieira, M. J. (2010a). Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(19), 6673-6679.
- Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J. (2010b). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.
- Söderling, E. M., Marttinen, A. M., Haukioja, A. L. (2011). Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Current microbiology*, 62(2), 618-622.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: Critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43(3), 793-808.
- Solomon, E. B., Niemira, B. A., Sapers, G. M., Annous, B. A. (2005). Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *Journal of food protection*, 68(5), 906-912.

- Somers, E. B., Johnson, M. E., Wong, A. C. L. (2001). Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal Dairy Sci.*, 84, 1926–1936
- Soni, K. A., Oladunjoye, A., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., Silva, J. L., Mikel, B., Bailey, R. H. (2013). Inhibition and inactivation of Salmonella Typhimurium biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *Journal of food protection*, 76(2), 205-212.
- Soria, M.A. 2012. Presencia de Salmonella y características físicas de huevos destinados a consumo humano. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Litoral.
- Soria, M.C. 2013. Salmonella y aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras comerciales. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata.
- Sorongon, ML, Bloodgood, RA, Burchard, RP. (1991). Hydrophobicity adhesion and surface-exposed proteins of gliding bacteria. *Appl Environ Microbiol* 57: 3193–3199
- Sorroche, F., L. Rinaudi, A. Zorreguieta, W. Giordano. (2010). EPS II-dependent autoaggregation of Sinorhizobium meliloti planktonic cells. *Current Microbiol.* 61:465-470.
- Sorroche, F. G., Spesia, M. B., Zorreguieta, Á., Giordano, W. (2012). A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native Sinorhizobium meliloti isolates from Argentina. *Applied and environmental microbiology*, AEM-07826.
- Speranza, B., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. (2011). Effects of nutritional and environmental conditions on Salmonella sp. biofilm formation. *Journal of food science*, 76(1), M12-M16.
- Spiers, A. J., J. Bohannon, S. M. Gehrig, and P. B. Rainey. (2003). Biofilm formation at the air-liquid interface by the Pseudomonas fluorescens SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* 50:15–27.
- Srinandan, C. S., Elango, M., Gnanadhas, D. P., Chakravorty, D. (2015). Infiltration of matrix-non-producers weakens the Salmonella biofilm and impairs its antimicrobial tolerance and pathogenicity. *Frontiers in microbiology*, 6, 1468.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179.
- Stepanovic, S., Irkovi, I., Ranin, L., Svabi-Vlahovi M. (2004). Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. *Lett Appl Microbiol* 38(5):428-432.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. (2012). Salmonella biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502-531.

- Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D.G.; Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209
- Stoodley P, Cargo R, Rupp C J, Wilson S, Klapper L. (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Industrial Microbiol. Biotechnol.* 29, 361-367.
- Strevett, K.A.; Chen, G. (2003). Microbial surface thermodynamics and applications. *Res. Microbiol.*, 154, 329-335.
- Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzychczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. (2005). The in vitro activity of vaginal Lactobacillus with probiotic properties against Candida. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 13(2):69–75.
- Sutherland IW. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3-9.
- Talarico TL, Dobrogosz WJ (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus reuteri. *Antimicrob Agents Chemother*, 33(5):674-679.
- Tam CK, Morris C, Hackett J. (2006). The Salmonella enterica serovar Typhi type IVB selfassociation pili are detached from the bacterial cell by the PilV minor pilus proteins. *Infect Immunology*, 74:5414–5418
- Tahmourespour, A., Kermanshahi, R.K. (2011). The effect of a probiotic strain (Lactobacillus acidophilus) on the plaque formation of oral streptococci. *Bosn J Basic Med Science*, 11,37–40.
- Terraf, M. L., Juárez Tomás, M. S., Nader-Macías, M. E. F., Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of applied microbiology*, 113(6), 1517-1529.
- Teixeira, P.; Lopes, Z.; Azeredo, J.; Oliveira, R.; Vieira, M.J. (2005). Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiol.*, 22, 247-251.
- Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H., Samaranayake, L. P. (2005). Oral bacteria modulate Candida biofilm formation. The International Association for Dental Research—20th Annual Scientific Meet-ing of the Southeast Asia Division and Southeast Asia Association for Dent.
- Trejo, F. M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L. (2010). Co-culture with potentially probiotic microorganisms antagonises virulence factors of Clostridium difficile in vitro. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98(1), 19-29.
- Trunk, T., Salah Khalil, H., Leo, J. C. (2018). Bacterial autoaggregation. *Aims Microbiology*, 4(1), 140-164.

- Twetman L, Larsen U, Fiehn N-E, Stecksen-Blicks C, Twetman S. (2009). Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: an in vitro study. *Acta Odontol Scand*, 67: 284–288.
- Vaccari, L., Molaei, M., Niepa, T. H., Lee, D., Leheny, R. L., Stebe, K. J. (2017). Films of bacteria at interfaces. *Advances in colloid and interface science*, 247, 561-572.
- Van der Mei, H. C., Van de Belt-Gritter, B., Pouwels, P. H., Martinez, B., Busscher, H. J. (2003). Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins—a study in recombinant lactobacilli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 28(2-3), 127-134.
- Van Houdt R, Michiels C. (2005). Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Res. Microbiol.* 156:626–33
- Van Houdt, R., Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1117-1131.
- Vatsos, I. N., Thompson, K. D., Adams, A. (2001). Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and n-hexadecane. *Letters in applied microbiology*, 33(3), 178-182.
- Velge, P., Cloeckart, A., Barrow, P. (2005). Emergence of Salmonella epidemics: The problem related to Salmonella enterica serotype enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, 36, 267–288.
- Vieira, M. J., Melo, L., Pinheiro, M. M. (1993). Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling*, 7, 67–80.
- Vlkov AE, Rada V, Mehilov A, Killer J. (2008). Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiol.* 53:263-269.
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7):2535–54.
- Vyas N., Sammons R. L., Addison O., Dehghani H., Walmsley A. D. (2016). A quantitative method to measure biofilm removal efficiency from complex biomaterial surfaces using SEM and image analysis. *Scientific reports*, 6, 32694.
- Wadstrom T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B. (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Bacteriol* 62:513–520.
- Wadström T. (1990). Hydrophobic characteristics of staphylococci: role of surface structures and role in adhesion and host colonization. *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, 315–333.
- Wagner C., Hensel M. (2011). Adhesive Mechanisms of Salmonella enterica. *Bacterial Adhesion*, 17–34.
- Walter J, Schwab C, Loach DM, Ganzle MG, Tannock GW. (2008) Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell

aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology*, 154(Pt 1):72–80.

Wang H., Ding S., Dong Y., Ye K., Xu X., Zhou G. (2013). Biofilm formation of Salmonella serotypes in simulated meat processing environments and its relationship to cell characteristics. *Journal of food protection*, 76(10), 1784-1789.

Wang H., Ye K., Wei X., Cao J., Xu X., Zhou, G. (2013). Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of Salmonella isolates from a chicken slaughter plant in China. *Food Control*, 33, 378–384.

Wang J., Zhao X., Yang Y., Zhao A., Yang Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International journal of biological macromolecules*, 74, 119-126.

Wang H., Dong Y., Wang G., Xu X., Zhou G. (2016). Effect of growth media on gene expression levels in Salmonella Typhimurium biofilm formed on stainless steel surface. *Food control*, 59, 546-552.

Wang L., He Z., Tian P., Wang G. (2019). Lactic Acid Bacteria and Host Immunity. In *Lactic Acid Bacteria*. Springer, 261-296.

Wasfi R., Abd El-Rahman O. A., Zafer M. M., Ashour H. M. (2018). Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(3), 1972-1983.

Wellman-Labadie O., Picman J., Hincke M. T. (2008). Comparative antibacterial activity of avian egg white protein extracts. *British poultry science*, 49(2), 125-132.

Weiss-Muszkat M., Shakh D., Zhou Y., Pinto R., Belausov E., Chapman M. R., Sela S. (2010). Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55: H7, an atypical enteropathogenic strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(5), 1545-1554.

Wells T. J., Sherlock O., Rivas L., Mahajan A., Beatson S. A., Torpdahl M., Schembri M. A. (2008). EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environmental microbiology*, 10(3), 589-604.

Whitchurch C B, Tolker-Nielsen T, Ragas P C, Mattick J S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295, 1487.

White, A. P., Gibson, D. L., Collinson, S. K., Banser, P. A., Kay, W. W. (2003). Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5398–5407.

White, A. P., Gibson, D. L., Kim, W., Kay, W. W., Surette, M. G. (2006). Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *Journal of bacteriology*, 188(9), 3219-3227.

Wicker-Böckelmann U, Wingender J, Winkler U K. (1987). Alginate lyase releases cell-bound lipase from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 266(3-4), 379-89.

Winfield, M. D., Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3687–3694.

Wingender. J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A. Flemming, H.-C. (2001). Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol*. 336, 302–314.

Wong, G. C., O'Toole, G. A. (2011). All together now: Integrating biofilm research across disciplines. *Mrs Bulletin*, 36(5), 339-342.

Woo, J., Ahn, J. (2013). Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, 56(4), 307-313.

Wu, C. C., Lin, C. T., Wu, C. Y., Peng, W. S., Lee, M. J., Tsai, Y. C. (2015). Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Molecular oral microbiology*, 30(1), 16-26.

Xie, G. J., Liu, T., Cai, C., Hu, S., Yuan, Z. (2018). Achieving high-level nitrogen removal in mainstream by coupling anammox with denitrifying anaerobic methane oxidation in a membrane biofilm reactor. *Water research*, 131, 196-204.

Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in applied microbiology*, 49(4), 434-442.

Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., Meng, J. (2010). Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *International journal of food microbiology*, 141(1-2), 63-72.

Zakaria Gomaa E. (2013). Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J Gen Appl Microbiol* 59(6):425–436

Zhang W, Wang H, Liu J, Zhao Y, Gao K, Zhang J. (2013). Adhesive ability means inhibition activities for *Lactobacillus* against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. *Anaerobe*. 22:1–7.

Zhou, D., M. S. Mooseker, J. E. Galan. (1999). An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10176–10181.504.

Zhou, D., M. S. Mooseker, J. E. Galan. (1999). Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science*, 283:2092–2095.

Ziech, R. E., Perin, A. P., Lampugnani, C., Sereno, M. J., Viana, C., Soares, V. M., dos Santos Bersot, L. (2016). Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 85-90.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology*, 39(6), 1452-1463.