

**“Desgraciados los pueblos donde la juventud  
no haga temblar al mundo y los estudiantes se  
mantengan sumisos ante el tirano”**

Lucio Cabañas Barrientos



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE  
LA REPÚBLICA (PROPAC)**

**“ESTUDIO DEL PROCESO DE BIOENSUCIAMIENTO CON LECHE  
PARA LA INDUSTRIA LÁCTEA”**

**TESIS**

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**M en C RODRIGO JIMÉNEZ PICHARDO**

**DIRIGIDA POR:**

**DRA. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**

**CODIRIGIDO POR:**

**DR. YUNNY MEAS VONG**



**Universidad Autónoma de Querétaro.**  
**Facultad de Química.**  
**Doctorado en Ciencias de los Alimentos.**

**“Estudio del proceso de bioensuciamiento con leche para la industria láctea.”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias de los Alimentos**

**Presenta:**

M en C Rodrigo Jiménez Pichardo

**Dirigido por:**

Dra. Blanca Estela García Almendárez

**Codirigido por:**

Dr. Yunny Meas Vong

**SINODALES**

Dra. Blanca E. García Almendárez

Director

Dr. Yunny Meas Vong

Codirector

Dr. Carlos Regalado González

Asesor

Dr. José Santos Cruz

Asesor

Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte

Asesor

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
 Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia  
 Loarca Piña  
 Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
 Enero de 2018  
 Querétaro, Qro. México.

## RESUMEN

Los componentes de la leche pueden formar depósitos sobre superficies abióticas de acuerdo con sus características fisicoquímicas y la rugosidad superficial, y se pueden clasificar según su componente principal en tipo A (proteínas) y tipo B (minerales). La primera etapa de la formación de biopelículas es la adhesión de microorganismos a superficies de acero, preacondicionadas mediante un ensuciamiento que favorece y aumenta las interacciones, en conjunto los depósitos y microorganismos forman un bioensuciamiento. Este proceso de bioensuciamiento es complejo y puede representar una contaminación persistente en la industria láctea. La presencia de depósitos puede disminuir el diámetro de las tuberías y la eficiencia en el intercambio de calor. Un proceso de limpieza y desinfección ineficiente puede favorecer el desarrollo del bioensuciamiento, por lo que el estudio tiene una gran importancia para asegurar la inocuidad de los alimentos procesados. El objetivo general de este proyecto fue estudiar el proceso de formación de los depósitos (tipo A y B), así como de la biopelícula formada por la microbiota de la leche cruda, sobre dos tipos de acero inoxidable. Los depósitos se formaron sobre placas de acero inoxidable 304-2B y acero electropulido, a diferentes temperaturas y tiempos. Debido a la presencia de estos depósitos aumentó la rugosidad promedio (Ra) del acero 304-2B ( $30.7 \pm 0.1$  nm tipo A y  $42.2 \pm 0.2$  nm tipo B) y la energía libre superficial (ELS) ( $62.2 \pm 5.9$  J/m<sup>2</sup> tipo A y  $61.9 \pm 0.3$  J/m<sup>2</sup> tipo B), en comparación con las placas sin depósitos (Ra:  $30.7 \pm 0.1$  nm y ELS:  $49.1 \pm 3.6$  J/m<sup>2</sup>). Una vez establecidos los depósitos se utilizó leche cruda para favorecer la formación de biopelículas. Los microorganismos recuperados de las placas de acero 304-2B con depósitos tipo A ( $6.8 \pm 0.8$  log UFC/cm<sup>2</sup>), son significativamente diferentes a las placas tipo B ( $6.2 \pm 0.2$  log UFC/cm<sup>2</sup>) y sin depósitos ( $6.2 \pm 0.1$  log UFC/cm<sup>2</sup>). El acero electropulido presentó un mayor incremento en la Ra, ELS y en los microorganismos recuperados, por la presencia de los depósitos tipo A, en comparación con los depósitos tipo B y sin depósitos. Esta diferencia se debe al aumento de hidrofiliidad e interacciones en la superficie. Además, se observó mediante microscopía fluorescente la viabilidad de los microorganismos dentro de las biopelículas. Por otro lado, la técnica FISH permitió identificar la distribución microbiana: bacterias, bacterias ácido lácticas y levaduras, además se logró la hibridación de *Listeria* spp., cuya presencia representa un riesgo a la salud pública. La presencia de grupos polares, anillos aromáticos y amidas, entre otros, identificados por espectroscopía Raman en la superficie podrían haber favorecido las interacciones entre la materia orgánica y los microorganismos.

Palabras clave: Leche cruda, bioensuciamiento, FISH, energía libre superficial

## SUMMARY

Milk components can form deposits on abiotic surfaces according to their physicochemical characteristics and surface roughness, and can be classified according to their main component in type A (proteins) and type B (minerals). The first stage biofilms formation is the adhesion of microorganisms to steel surfaces, preconditioned by a fouling that favors and increases interactions, together deposits and microorganisms form a biofouling. Biofouling process is complex and may represent persistent contamination for the dairy industry. Presence of deposits can decrease the pipes diameter and the efficiency in heat exchange. An inefficient cleaning and disinfection process can favor the development of biofouling, so the study is very important to ensure the safety of processed foods. The general objective of this project was to study the deposits (type A and B) formation process, as well as the biofilm formed by the microbiota of raw milk, on two types of stainless steel. Deposits were formed on 304-2B stainless steel plates and electropolished steel plates, at different temperatures and times. Due to the presence of these deposits, the average roughness (Ra) of steel 304-2B ( $30.7 \pm 0.1$  nm type A and  $42.2 \pm 0.2$  nm type B) and surface free energy (ELS) ( $62.2 \pm 5.9$  J/m<sup>2</sup> type A and  $61.9 \pm 0.3$  J/m<sup>2</sup> type B) increased compared to plates without deposits (Ra:  $30.7 \pm 0.1$  nm and ELS:  $49.1 \pm 3.6$  J/m<sup>2</sup>). Once the deposits were formed, raw milk was used to favor the formation of biofilms. The number of microorganisms recovered from 304-2B steel plates with type A deposits ( $6.8 \pm 0.8$  log CFU/cm<sup>2</sup>), differ significantly from type B plates ( $6.2 \pm 0.2$  log CFU/cm<sup>2</sup>) and without deposits ( $6.2 \pm 0.1$  log CFU/cm<sup>2</sup>). Electropolished steel showed an increase in Ra, ELS and microorganisms recovered by the presence of type A deposits, in comparison with type B deposits and without deposits. In addition, the viability of the microorganisms within the biofilms was observed by fluorescent microscopy. On the other hand, the FISH technique allowed to identify the microbial distribution: bacteria, lactic acid bacteria and yeasts. Besides, hybridization of *Listeria* spp., whose presence represents a risk to public health, was achieved. Presence of polar groups, aromatic rings and amides, among others, identified by Raman spectroscopy on the surface could have favored interactions between organic matter and microorganisms.

Keywords: Raw milk, biofouling, FISH, surface free energy

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, (CONACYT), por la beca de doctorado número 277746, recibida durante el periodo 2013-2017.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro**, por el apoyo a mi formación profesional y personal.

Al **Programa de Posgrados en Alimentos del Centro de la Republica**, por abrirme sus puertas y darme las armas necesarias para enfrentarme a los retos profesionales.

A la **Doctora Blanca García**, por recibirme en su equipo, nuevamente, y por todo el apoyo recibido a lo largo de estos años y proyectos. Sus conocimientos y consejos fueron la guía para que este trabajo llegara a buen puerto. Gracias por haber creído en mí durante este tiempo.

Al **Doctor Yunny Meas**, por todo el apoyo y la facilitación de equipos necesarios para la realización de los experimentos.

A los **Doctores Carlos Regalado, José Santos** y a la **Doctora Carmen Wachter**, por sus consejos y observaciones, sin su aporte no hubiera sido posible concluir este trabajo.

A todos aquellos **Maestros y Doctores**, que compartieron desinteresadamente sus conocimientos y experiencias, ayudando a mi formación.

## DEDICATORIAS

A **Irais** por ser mi compañera de vida, por su apoyo en momentos fáciles y difíciles, pero sobre todo, por darme ese gran regalo que ilumina nuestras vidas. ¡Te amo inconmensurablemente!

A **Sofía** por darme las fuerzas para intentar ser mejor padre, mejor ser humano y mejor profesionalista.

A mis padres, **Eugenio** y **Margarita**, por apoyarme en estos años. Sin ustedes no sería quien soy ahora. Espero poder regresarles algo de todo lo que me han dado.

A mi hermana, amiga y cómplice **Magali** y a sus pequeña princesa, **Rebeca** y **Natalia**, sin ustedes esta vida no sería igual. Gracias por caminar a mi lado, por el apoyo y por siempre creer en mí.

A mis **Tías, Tíos, Primos**, a mi **Abuelo** y a todos los que ya no están pero que siguen a mi lado. Les agradezco todo el amor y apoyo que me han dado.

A la familia **Sánchez Ortega**, por aceptarme en sus filas y por hacerme sentir parte de algo muy especial.

A **Víctor**, por estar a mi lado durante tantos años, por su amistad y por demostrarme que no es necesario compartir sangre para ser hermanos.

A **Teresita**, por compartir su vida conmigo. Gracias por ser mi amiga y por hacer divertido el tiempo en el laboratorio. Te llevo en el corazón.

A todos y cada uno de los compañeros que pasaron por el **laboratorio de biotecnología**, por dejar una huella en mi vida durante tantos años.

A la **luna** por acompañarme en esas caminatas, por ser mi confidente y consejera y por recordarme que en algún lugar hay alguien que me cuida a donde quiera que vaya. Una vez más gracias **Mamá Bella**.

En fin, nuevamente a todos aquellos que creyeron en mí y a los que no también. Esto va por todos ustedes.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Microbiología de la leche	3
2.2. Control de microorganismos	3
2.3. Formación de depósitos y biopelículas	5
2.4. Mecanismo de formación del ensuciamiento	7
2.5. Mecanismo de formación de biopelículas	8
2.6. Visualización de las biopelículas	11
2.6.1. Viabilidad celular	12
2.6.2. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	14
2.7. Espectroscopia Raman	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
6. METODOLOGÍA	20
6.1. Material biológico	20

6.2. Placas de acero inoxidable	20
6.3. Formación de bioensuciamiento sobre las placas de acero	20
6.3.1. Formación de depósitos tipo A	20
6.3.2. Formación de depósitos tipo B	21
6.3.3. Formación de biopelículas	21
6.4. Caracterización superficial de las placas de acero sin y con depósitos	22
6.4.1. Determinación de la energía libre superficial del acero inoxidable	22
6.4.2. Determinación del ángulo de contacto	23
6.4.3. Rugosidad superficial	24
6.4.4. Espesor de los depósitos	24
6.4.5. Análisis elemental de los depósitos tipo A o B	24
6.5. Determinación de comunidades microbianas en las biopelículas mediante técnicas de microscopía y métodos moleculares	25
6.5.1. Viabilidad celular dentro de las biopelículas	25
6.5.2. Microscopía FISH	26
6.5.3. Caracterización molecular de los microorganismos en la biopelícula	28
6.5.3.1. Extracción de ADN genómico	28
6.5.3.2. Amplificación del gen 16S rRNA de bacterias y del gen 26S RNA de levaduras	28
6.5.3.3. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)	30
6.6. Espectroscopía Raman	31
7. RESULTADOS	32
7.1. Formación de depósitos de proteínas y minerales sobre la superficie de acero inoxidable.	32
7.1.1. Análisis elemental de los depósitos formados en la superficie de las placas.	34
7.2. Caracterización superficial de las placas de acero sin y con depósitos	37

7.2.2. Determinación de la energía libre superficial	40
7.2.3. Topografía superficial de las placas de acero	42
7.3. Formación de biopelículas sobre depósitos de leche cruda, formados sobre placas de acero inoxidable	44
7.4. Viabilidad de las células dentro de la biopelícula	48
7.5. Microscopía FISH	52
7.6. Espectroscopía Raman	60
7.7. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)	69
8. CONCLUSIÓN	78
9. BIBLIOGRAFÍA	81

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>1</b>	Tratamientos térmicos en alimentos.	<b>5</b>
<b>2</b>	Sondas utilizadas para la técnica FISH.	<b>27</b>
<b>3</b>	Mezcla de las reacciones de PCR.	<b>29</b>
<b>4</b>	Composición de los depósitos tipo A y B, utilizando leche cruda.	<b>33</b>
<b>5</b>	Ángulo de contacto de diferentes líquidos modelo sobre placas de acero inoxidable 304-2b y electropulido, sin y con depósitos tipo A o B adheridos.	<b>39</b>
<b>6</b>	Energía libre superficial de placas de acero 304-2B y electropulido, sin y con depósitos tipo A o B sobre la superficie.	<b>42</b>
<b>7</b>	Rugosidad superficial y espesor de los depósitos adheridos a las placas de acero inoxidable.	<b>44</b>
<b>8</b>	Asignación de grupos funcionales asociados a señales del espectro Raman de placas con depósitos tipo A o B adheridos a la superficie (adaptado de Schwartz <i>et al.</i> 2009; Wagner <i>et al.</i> 2009; You-Peng <i>et al.</i> 2013; Wang <i>et al.</i> 2013).	<b>66</b>
<b>9</b>	Concentración de ADN total extraído de las biopelículas formadas sobre placas de acero con depósitos tipo A o B.	<b>70</b>
<b>10</b>	Concentración de ADN eluido de las bandas cortadas del gel de DGGE de las biopelículas formadas sobre placas de acero con depósitos tipo A o B.	<b>73</b>
<b>11</b>	Intensidad de las bandas y abundancia relativa de las especies encontradas en el gel DGGE de las biopelículas formadas sobre acero inoxidable.	<b>76</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- 1 Casos extremos de depósitos de materia orgánica al interior de las tuberías de la industria láctea; a) depósitos tipo A; y b) depósitos tipo B. **6**
- 2 Biopelículas de *P. aeruginosa*, cultivadas en leche, sobre acero inoxidable (Adaptado de Caixeta *et al.*, 2010). **7**
- 3 Etapas de formación de biopelículas: 1) Fijación; 2) Desarrollo; 3) Maduración; 4) Desprendimiento; y 5) Colonización en otro nicho. **10**
- 4 Depósitos tipo A, formados por leche cruda sobre placas de acero (2.54x2.54cm de lado. a) depósitos después de 30 min de calentamiento a 90°C con leche cruda; b) depósitos con 24 h de secado a 70°C. **33**
- 5 Depósitos tipo B, formados por leche cruda sobre placas de acero (2.54x2.54cm de lado. a) depósitos con leche cruda después de 5 min de calentamiento a 121°C; b) depósitos con 24 h de secado a 70°C. **33**
- 6 Componentes del acero inoxidable analizados en las placas de acero inoxidable tipo 304. **36**
- 7 Componentes mayoritarios de las proteínas (C, O y N) y minerales (P y Ca), analizados en la superficie de las placas de acero inoxidable tipo 304. **37**
- 8 Cuenta total de microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre la superficie del acero inoxidable 304, sin y con depósitos tipo A o B adheridos. Agar nutritivo (NA): Cuenta de microorganismos aerobios. De Man, Rogosa y Sharpe (MRS): Bacterias ácido lácticas. Agar papa-dextrosa (PDA): Levaduras. **45**

- 9** Cuenta total de microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre la superficie del acero electropulido, sin y con depósitos tipo A o B adheridos. Agar nutritivo (NA): Cuenta de microorganismos aerobios. De Man, Rogosa y Sharpe (MRS): Bacterias ácido lácticas. Agar papa-dextrosa (PDA): Levaduras. **46**
- 10** Micrografías de placas control, a) placas con bioensuciamiento, sin mezcla de fluoróforos; b) placas sin bioensuciamiento, con mezcla de fluoróforos. **48**
- 11** Micrografías de placas con depósitos tipo A y biopelículas teñidas con SYTO9 y PI. a) 40x; b) intensidad de la fluorescencia. **49**
- 12** Micrografías de placas con depósitos tipo B y biopelículas teñidas con SYTO9 y PI. a) 40x; b) intensidad de la fluorescencia. **50**
- 13** Micrografías de placas de acero electropulido con depósitos tipo A y biopelículas teñidas con SYTO9 y PI. a) 40x; b) intensidad de la fluorescencia. **51**
- 14** Micrografía de placas de acero electropulido con depósitos tipo B y biopelículas teñidas con SYTO9 y PI. a) 40x; b) 63x. **51**
- 15** Micrografías de placas control, placas con bioensuciamiento, sin mezcla de fluoróforos. **52**
- 16** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda EUB338 (bacterias), sobre placas de acero 304-2B con depósitos, a) tipo A (40x); y b) tipo B (40x). **54**

- 17** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda PF2 (levaduras) sobre placas de acero 304-2B con depósitos y biopelículas a) tipo A (20x); y b) tipo B (40x). **54**
- 18** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda Strc493 (*Streptococcus* spp., y *Lactococcus* spp.), de placas de acero con depósitos, a) tipo A (40x); y b) tipo B (40x). **55**
- 19** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda Lis-637 (*Listeria* sp.) de placas de acero con depósitos, a) tipo A (40x); y b) tipo B (40x). **56**
- 20** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda EUB338 (Bacterias), de placas de acero electropulido con depósitos, a) tipo A (20x); y b) tipo B (20x). **57**
- 21** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda PF2 (levaduras), de placas de acero electropulido con depósitos, a) tipo A (20x); y b) tipo 338B (20x). **58**
- 22** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda Strc493 (*Streptococcus* spp., y *Lactococcus* spp.), de placas de acero electropulido con depósitos, a) tipo A (20x); y b) tipo 338B (20x). **59**
- 23** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda Lis-637 (*Listeria* spp.), de placas de acero electropulido con depósitos, a) tipo A (40x); y b) tipo 338B (20x). **60**
- 24** Espectro Raman de la superficie del acero 304-2B. Línea azul escala 0-160 cps, Línea roja escala 0-0-025 cps. **62**
- 25** Espectro Raman de los componentes principales de la leche. a) Agua; b) Caseína; c) Ácidos grasos (mantequilla derretida, ~86% grasa); y d) Lactosa (extraído de Mazurek *et al.* 2015). **63**

<b>26</b>	Espectro Raman de la superficie del acero 304-2B con depósitos tipo A (línea azul) o tipo B (línea roja).	<b>64</b>
<b>27</b>	Espectro Raman de las placas de acero 304-2B con depósitos tipo A (línea azul) o tipo B (línea roja).	<b>68</b>
<b>28</b>	Gel de agarosa (1%) para las muestras de ADN total de las biopelículas a los días 1, 3 y 5 de maduración, sobre placas de acero inoxidable con depósitos tipo A (carriles 2, 3 y 4) y tipos B (carriles 5, 6 y 7).	<b>70</b>
<b>29</b>	Gel de agarosa para los productos de la primera ronda de amplificación de la PCR anidada.	<b>71</b>
<b>30</b>	Gel de agarosa para los productos de la segunda ronda de amplificación de la PCR anidada.	<b>71</b>
<b>31</b>	Gel completo de DGGE (30-60%) para los productos de PCR para las muestras de ADN genómico total, carriles 1: 1A; 2: 3A; 3: 5A; 4: X; 5: 1B; 6: 3B; y 7: 5B.	<b>72</b>
<b>32</b>	Especies identificadas en el gel de DGGE (30-60%) de las biopelículas formadas sobre placas de acero con depósitos tipo A o B.	<b>74</b>
<b>33</b>	Abundancia relativa de las especies encontradas en el gel de DGGE de bacterias encontradas en las biopelículas, a diferentes tiempos de maduración, sobre ambos tipos de ensuciamiento.	<b>77</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El aseguramiento de la inocuidad de los alimentos es de suma importancia para la industria alimentaria, debido a que los alimentos contaminados pueden ser una fuente de agentes infecciosos, provocando brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) que pueden tener una alta morbilidad y mortandad a nivel mundial. Entre los principales alimentos responsables de brotes de enfermedades destacan el huevo y sus derivados, los productos lácteos y los productos cárnicos. Los factores como un mal manejo de la temperatura, uso de materia prima contaminadas, manipulación inadecuada de los alimentos y una limpieza deficiente de los equipos o utensilios tienen un impacto directo en la inocuidad y se han determinado como factores que contribuyen a la aparición de brotes.

Para limpiar y desinfectar las materias primas, los productos terminados y los equipos se utilizan agentes químicos de naturaleza diversa, la efectividad para remover contaminantes depende del agente. La mayoría de estos agentes tienen riesgos relacionados tanto en su transporte y almacenamiento como en su uso, por ejemplo, el cloro, que es muy utilizado, es corrosivo para las superficies e irritante para las mucosas y piel de los usuarios, por lo que se han buscado agentes que cuenten con la misma o mayor efectividad pero que se reduzcan los riesgos asociados a su manejo y aplicación, además que sean más amigables con el medio ambiente.

Debido a una limpieza y desinfección inadecuada de los equipos se puede favorecer la formación de depósitos de materia orgánica, propia de la leche, con lo que se presentan problemas como la deficiente transferencia del calor o la disminución del diámetro interior de la tubería, con lo que se aumenta la energía necesaria tanto para que el calentamiento sea uniforme como para bombear los fluidos por el interior de estos. La presencia de estos depósitos puede favorecer la adhesión de bacterias y la posible formación de formas de resistencia como las biopelículas y los problemas que esto conlleva.

Para evitar esta formación de depósitos y biopelículas se han desarrollado sistemas de limpieza y desinfección, como el sistema llamado "Clean-In-Place", el cual es uno de los sistemas más utilizados en la industria láctea. Este sistema ha sido objeto de mejoras con el fin de eliminar el uso de los agentes tradicionales (álcalis o ácidos fuertes) y disminuir la cantidad de agua, por ende, este sistema sería más amigable con el ambiente.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Microbiología de la leche

Debido a su alto contenido de nutrientes la leche puede soportar el crecimiento de un gran número de microorganismos, tanto benéficos, como los llamados probióticos, así como patógenos y deterioradores. En condiciones normales la leche dentro de la glándula mamaria tiene un nivel bajo de microorganismos, este estado se pierde inmediatamente después de ser ordeñada, ya que, al estar en contacto con las superficies se puede dar una contaminación por el propio animal, como el medio ambiente, los equipos, el contacto humano, así como durante el proceso, transporte o almacenamiento (Nada *et al.*, 2012). Esta contaminación afecta directamente la calidad nutricional y sensorial de la leche, comprometiendo la inocuidad del alimento.

Los microorganismos que se encuentran con mayor frecuencia en la leche pertenecen a la familia de bacterias ácido lácticas (BAL), por ejemplo, algunas especies de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, entre otras, las cuales podrían considerarse como benéficas, ya que al producir ácido láctico le aporta cierta protección a la leche contra la microbiota patógena o deterioradora. Dentro de esta microbiota indeseable se encuentran microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros, así como algunas levaduras, hongos filamentosos y virus, presentes por un proceso de infección dentro de la glándula mamaria o debido a malas prácticas de manufactura, manejo y procesamiento (Tamine 2009).

### 2.2. Control de microorganismos

Para evitar o controlar el desarrollo de los microorganismos se han utilizado diferentes procedimientos, siendo los más utilizados los tratamientos térmicos, debido a su eficiencia para eliminar a los microorganismos patógenos y deterioradores. Este proceso térmico se conoce como pasteurización y consiste en

augmentar la temperatura de la leche y mantenerla por determinado tiempo. Con estos procedimientos se reduce el riesgo de que este alimento provoque un brote de enfermedades y a su vez prolonga la vida de anaquel de la leche y sus derivados (Nada *et al.*, 2012). En el Cuadro 1 se muestran los procesos de pasteurización más utilizados en la industria. Este procedimiento térmico no destruye las esporas ni las toxinas secretadas por los microorganismos, por lo que son necesarias pruebas adicionales para descartar la presencia de estos contaminantes (Britz y Robinson 2008).

La pasteurización a ultra alta temperatura (UHT), por sus siglas en inglés, tiene como finalidad obtener productos comercialmente estériles que puedan almacenarse a temperatura ambiente durante tiempos prolongados. Esto se logra elevando la temperatura de la leche a altas temperaturas (135-150°C) por cortos tiempos (2-3 s), en comparación con la esterilización donde se utilizan temperaturas entre 110-125°C por tiempos de 10 a 20 min. La destrucción de los microorganismos es total, por lo que se reduce la posibilidad de que cualquier microorganismo residual cause el deterioro del producto (Codex Alimentarius 1999).

La supervivencia de los microorganismos a estos procedimientos de control dependerá de factores como el número de microorganismos presentes, la capacidad de supervivencia de estos, así como la correcta realización del proceso, entre otros (Britz y Robinson 2008). En los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas o metodologías para mantener los estándares de calidad en los productos, tanto fisicoquímica como microbiológicamente. Un sistema que ha demostrado tener una alta eficiencia es el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), el cual se encarga de identificar, evaluar y controlar los riesgos, centrándose en la prevención de aquellos peligros identificados durante el proceso (Nada *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2013).

**Cuadro 1.** Tratamientos térmicos en alimentos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Termización	20 s	60-69
Lenta (LTLT)	30 min	63
Rápida (HTST)	15-17 min	72-76
UHT	2 s	135-150
Esterilización	10-20 min	110-125

LTLT: Baja Temperatura-Largo Tiempo, por sus siglas en ingles.

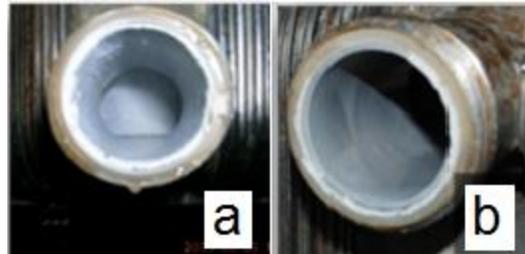
HTST: Alta Temperatura-Corto Tiempo, por sus siglas en ingles.

### **2.3. Formación de depósitos y biopelículas**

La presencia de grasa, proteínas, minerales, sales y además materia orgánica, aunado con las altas temperaturas, favorecen la adhesión y formación de depósitos sobre la superficie, lo que implica que sea necesario emplear una fuerza adicional para su remoción (Sigua *et al.*, 2010). Este proceso se favorece por una ineficiente remoción de los residuos durante la limpieza de las superficies, ya que la materia se va acumulando sobre las mismas. La velocidad de crecimiento de estos depósitos dependerá de las características de los alimentos producidos, en el caso de las industrias lácteas el crecimiento es rápido, gracias a la alta cantidad de proteínas presentes en la matriz y a las altas temperaturas (>60°C) y baja velocidad de flujo a las que se trabaja (Kukulka *et al.*, 2007).

En la industria láctea se presentan dos tipos de depósitos de materia orgánica, el tipo A y el tipo B. Los depósitos de tipo A (Fig. 1a) están compuestos principalmente de proteínas (50-70%) y de minerales (30-40%), la presencia de los otros componentes de la leche, como la grasa y carbohidratos, no tiene un papel importante en la formación de los depósitos. La presencia de este ensuciamiento sobre las superficies da una apariencia de tener un recubrimiento blanco, suave y esponjoso, por lo que también se les conoce como película de leche. Los depósitos tipo B (Fig. 1b) también son conocidos como “piedra de leche”, ya que el mayor componente de los mismos son los minerales de la leche (70-80%), principalmente el fosfato de calcio, la cantidad de proteínas en este tipo de ensuciamiento está

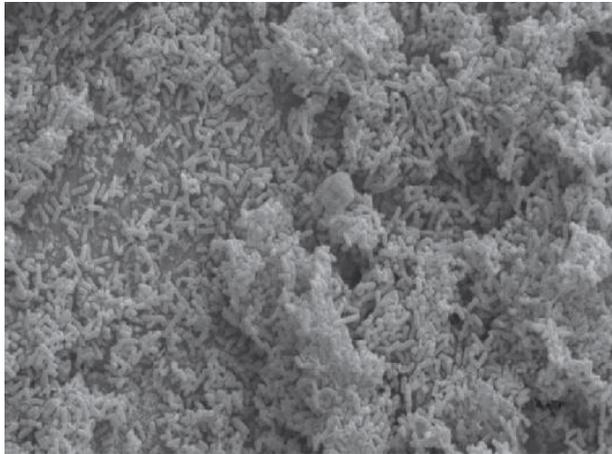
alrededor de 15%. Sobre las superficies esta piedra de leche se observa como un recubrimiento granular y compacto, de color gris (Bansal y Chen 2006).



**Figura 1:** Casos extremos de depósitos de materia orgánica al interior de las tuberías de la industria láctea; a) depósitos tipo A; y b) depósitos tipo B

Los depósitos de materia orgánica pueden actuar como preacondicionamiento para la adhesión de microorganismos y la posible formación de estructuras de resistencia como las biopelículas (Figura 2), las cuales son una forma diferenciada de las bacterias adheridas a la superficie, gracias a la formación de una matriz polimérica extracelular, que le dan una mayor resistencia contra los agentes de limpieza y desinfección, por lo que es difícil su eliminación y remoción (Young-Min *et al.*, 2012, Srey *et al.*, 2013).

El ensuciamiento de las superficies, ya sea por depósitos de materia orgánica o por la presencia de biopelículas puede ocasionar fuertes problemas, como la disminución de la eficiencia en el intercambio de calor, el bloqueo de tubos, el aumento de la presión y energía requeridas, retención de olores, corrosión de las superficies, entre otros factores, lo cual se refleja en una baja en la producción. Por lo tanto, resulta crítico realizar los procesos de lavado y desinfección adecuados para minimizar las posibilidades de la formación de depósitos y de biopelículas en el ambiente del procesamiento de alimentos (Davey *et al.*, 2013, Hai *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2013).



**Figura 2:** Biopelículas de *P. aeruginosa*, cultivadas en leche, sobre acero inoxidable (Adaptado de Caixeta *et al.*, 2010)

Esta adhesión de las macromoléculas y/o de las bacterias se ve favorecida por las características fisicoquímicas de la superficie, tales como la mojabilidad (hidrofobicidad e hidrofiliidad), energía libre superficial, rugosidad, composición química, cargas superficiales, entre otras. La energía libre superficial, representada por la capacidad de donar o aceptar electrones es una de las que tienen una mayor importancia (van Oss, 1995). Esta energía libre está dada por la suma de las interacciones tipo van der Waals, que son débiles e inducibles; y las interacciones ácido-base de Lewis, que son fuertes y representan la capacidad de donar o aceptar electrones (Patel *et al.*, 2013).

#### **2.4. Mecanismo de formación del ensuciamiento**

En los depósitos de materia orgánica la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) y el fosfato de calcio son los de mayor importancia. Durante el proceso de calentamiento se da una desnaturalización de la  $\beta$ -Lg, que es la proteína más sensible al calor ( $>70^{\circ}\text{C}$ ), con lo que se exponen los grupos sulfhidrilos, y debido a su reactividad pueden interaccionar con los otros componentes de la leche, por ejemplo, otras proteínas en forma nativa o desnaturalizadas por el calor. Con estas interacciones se van formando agregados de proteínas y minerales, los cuales pueden depositarse sobre

la superficie, lo que a su vez puede favorecer la agregación de otras moléculas y finalmente el establecimiento de la primera capa del ensuciamiento. Posteriormente, se da la interacción de otras moléculas inmersas en el cuerpo del líquido con esta primera capa. La estructura de los depósitos dependerá de la estructura de esta capa inicial y de la forma en que interactúe con la superficie, además la fuerza necesaria para remover dichos depósitos también dependerá de las interacciones con la superficie (Bansal y Chen 2006; Blanpain-Avet *et al.*, 2012). Las fuerzas que intervienen en esta atracción de los agregados sobre la superficie son las fuerzas de Van de Waals, las fuerzas electrostáticas, las interacciones ácido-base de Lewis y el movimiento Browniano (Sadeghinezhad *et al.*, 2013)

Conforme aumenta la temperatura del líquido (>110°C), la solubilidad de los minerales aumenta hasta que se llega al límite de solubilidad, después de este se favorece la formación de cristales sobre la superficie.

## **2.5. Mecanismo de formación de biopelículas**

La formación de biopelículas es una adaptación de las células procariotas, representando una forma de sobrevivir en ambientes hostiles y de colonizar nuevos nichos. Un gran número de microorganismos tiene la capacidad de formar biopelículas, la mayoría de las bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos están asociadas a la formación de biopelículas.

Se define una biopelícula como una comunidad microbiana adherida a una superficie, rodeada de una sustancia polimérica, llamada matriz (Hall *et al.*, 2009). Los componentes del material polimérico en el que están embebidos están compuestos por una mezcla de polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos teicoicos y nucleicos, y otras sustancias poliméricas, lo que le permite tener un ambiente con humedad relativa de entre 85 y 95% (Simões *et al.*, 2010). Esta matriz tridimensional da protección a la comunidad bacteriana contra la respuesta inmunitaria del huésped, el tratamiento con antibióticos, los agentes antimicrobianos, las condiciones adversas del medio ambiente como sequía, altas

temperaturas o presiones altas, además de que puede servir como fuente de alimento para las bacterias (Aider *et al.*, 2012)

La prevención del establecimiento de biopelículas en superficies es un punto crucial para el cumplimiento de la inocuidad y asegurar un producto de buena calidad. Cuando se ha establecido la biopelícula puede producir una contaminación constante e indefinida de los productos y su remoción resulta complicada. Un factor que favorece el establecimiento es una limpieza inadecuada de los equipos, ya que se van acumulando residuos de materia orgánica dando las condiciones apropiadas para el desarrollo de las bacterias (Latorre *et al.*, 2010).

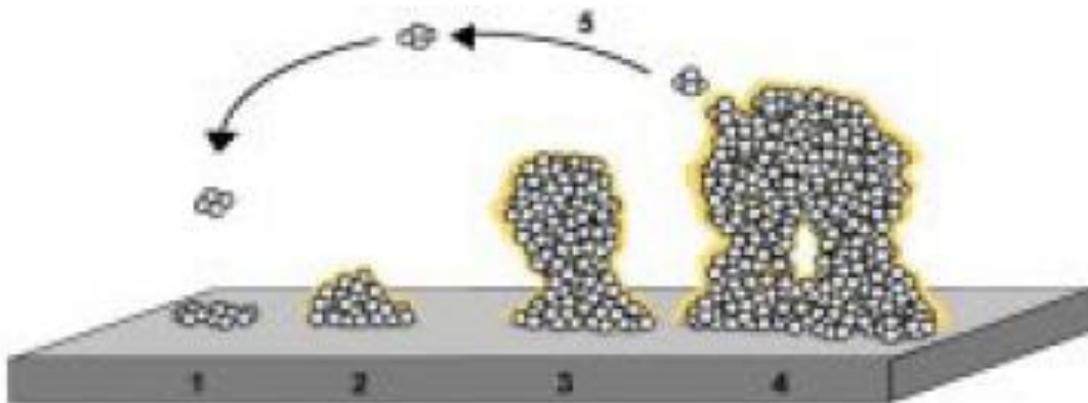
Se ha demostrado que el tipo de alimento procesado y el del material con el que está hecho el equipo, además de la topología de la superficie, son factores importantes en la formación y en la posterior eliminación de las biopelículas. Cuando la superficie del material presenta defectos o ralladuras son más difíciles de limpiar en comparación con aquéllas que son lisas, si a los defectos se unen algunas características, como cargas electrostáticas o fuerzas de van der Waals, propias de los materiales o el preacondicionamiento con materia orgánica la adhesión de las bacterias se ve facilitada.

La formación de las biopelículas consta de varias fases, las cuales son: 1) ataque inicial o adhesión; 2) formación de microcolonias y sustancias poliméricas; y 3) maduración de la biopelícula (Figura 3). Después de que ha madurado se puede presentar un desprendimiento de pequeñas fracciones de esta (fase 4), con lo que se favorece la colonización de nuevos nichos (fase 5). El factor que favorece este desprendimiento es el bajo nivel de fuentes de carbono en el microambiente, lo que aumenta la producción de sustancias poliméricas extracelulares y consecuentemente el crecimiento de la matriz. En aquellos lugares con una abundante fuente de carbono se favorecerá la adhesión de las fracciones desprendidas, esto es importante ya que si se realiza un lavado inadecuado y hay sobrevivencia de microorganismos libres o dentro de las biopelículas se encuentra en zonas poco accesibles, se puede dar una recontaminación del equipo o una

sobrevivencia de los microorganismos dentro de las biopelículas (Kumari *et al.*, 2014).

El ataque inicial o adhesión se divide en dos fases, la fase reversible y la no reversible. La primera son los primeros 5 a 30 s en los que se da la fijación de las células a la superficie. Dicha adhesión puede ser pasiva, por gravedad o dinámica de los fluidos; o activa, por flagelos, pilis, cargas electrostáticas, fuerzas de van der Waals, formación de cápsula bacteriana, entre otras. La fase irreversible comienza con la producción de los polímeros extracelulares, lo cual puede tomar desde 20 min hasta 4 h máximo, esto depende de cada bacteria y de su metabolismo.

La formación de microcolonias, segunda fase de la formación de biopelículas, resulta de la agregación y del crecimiento de las bacterias, acompañados por la formación de los materiales que componen la matriz extracelular. Cuando dos o más bacterias con la capacidad de formar biopelículas se unen la matriz tiene una composición más compleja, por lo que es más estable a las condiciones ambientales adversas.



**Figura 3:** Etapas de formación de biopelículas: 1) Fijación; 2) Desarrollo; 3) Maduración; 4) Desprendimiento; y 5) Colonización en otro nicho (Lasa *et al.* 2005).

Los genes responsables de la expresión y regulación de las vías de producción de polímeros extracelulares; dentro de los cuales pueden estar polisacáridos y proteínas, substituidas e insubstituidas, además de ácidos nucleicos, fosfolípidos, entre otros; que participan en la adhesión y formación de la estructura de la matriz de polímeros extracelulares se encienden bajo el estímulo externo de estrés ambiental (presión osmótica, pH, temperatura, falta de nutrientes, entre otros) o densidad de la población (Agle, 2007; Arevalos-Sanchez *et al.*, 2013).

Latorre *et al.* (2010), reportaron la recolección de muestras de un equipo de ordeña (tanque, tuberías y filtros) y del suelo en una planta procesadora de lácteos, encontraron 15 cepas de *L. monocytogenes*, aún después de hacer lavados de los equipos y de la planta. Por medio de microscopia electrónica de barrido observaron la presencia de biopelículas en las irregularidades de las superficies. Se tienen reportes indicando la presencia de biopelículas por largos periodos, incluso por años (Phillips, 2016).

Se ha reportado la presencia de biopelículas en acero inoxidable, vidrio, plástico, caucho, entre otros, algunas de los cuales son muy utilizados en los equipos para la industria alimentaria. Las consecuencias de la presencia de biopelículas en plantas de procesamiento de alimentos es que una contaminación continua de los productos reduce la vida de anaquel, puede ocasionar una reducción en la transferencia de calor, además ciertas bacterias podrían generar reacciones de corrosión en las superficies (Srey *et al.*, 2013). Por otro lado, la presencia de obstrucciones (bioensuciamiento o incrustaciones) en las tuberías provoca una caída considerable en la presión, por lo que es necesaria mayor potencia en el bombeo (Zhao *et al.*, 2005).

## **2.6. Visualización de las biopelículas**

El análisis de las biopelículas mixtas, requiere la identificación de las diferentes especies y su abundancia relativa dentro de la comunidad. Este proceso puede ser complicado, ya que dentro de las biopelículas se forman microambientes según las

necesidades y características de las microcolonias dentro del microambiente, por lo que un proceso de muestreo deficiente puede generar una subestimación de la heterogeneidad microbiana (Trevors, 2011). Wimpenny *et al.* (2000), estimaron que aproximadamente el 99.9% de los microorganismos embebidos en las biopelículas no son cultivables en las condiciones estándares, para evitar este problema se utiliza la biología molecular y sus herramientas. Una de estas herramientas es el uso de fluoróforos capaces de teñir diferencialmente a las células que mantienen íntegra la membrana, consideradas viables, y aquellas que presentan alguna disrupción en la membrana, consideradas no viables (Montañez-Izquierdo *et al.*, 2012).

### **2.6.1. Viabilidad celular**

La viabilidad celular se puede definir como la capacidad de una célula para crecer como una colonia visible en un medio de cultivo bacteriológico. La muerte celular solo es posible determinarla en retrospectiva, es decir, por diferencia entre el conteo con un método indirecto (por ejemplo, turbidez o densidad celular) y un método directo (por ejemplo, conteo en placa de unidades formadoras de colonias). Los estados intermedios, por ejemplo, las células bajo condiciones de estrés o el estado viable no cultivable, son difíciles de detectar por la reversibilidad del estado no cultivable de las células que encuentran condiciones favorables para su desarrollo, estas condiciones óptimas variarán para cada microorganismo, por tanto, el grado de reversibilidad también dependerá de cada microorganismo. Por esto se desarrollaron indicadores de viabilidad que se pueden evaluar evitando el cultivo celular (Stiefel *et al.*, 2015). Dichos indicadores están basados en criterios que reflejan la integridad celular o su correcto funcionamiento, utilizando moléculas fluorescentes detectables por microscopía epifluorescente o citometría de flujo o en estado sólido, entre otras. Estas herramientas son útiles para determinar el efecto de algún tratamiento antimicrobiano evitando el cultivo tradicional (Berney *et al.*,

2007). Existe una controversia para definir la viabilidad o la muerte celular, ya que, el hecho de que la integridad de la membrana se encuentre comprometida no necesariamente significa que la célula está muerta, porque bajo ciertas condiciones la membrana puede estar intacta pero la actividad metabólica está inactiva. Por otro lado, en un medio rico en nutrientes si las células se encuentran en la fase exponencial del crecimiento, la permeabilidad de la membrana aumenta para el transporte de nutrientes (Rohde *et al.*, 2015; Stiefel *et al.*, 2015).

Comercialmente se encuentran disponibles kits que ofrecen una combinación de fluoróforos con características diferentes que permiten diferenciar el estado metabólico celular, dentro de estos uno de los más utilizados es el kit LIVE/DEAD® BacLight™ de la marca Invitrogen, el cual consta del fluoróforo SYTO9 (Ex/Em 420/580) y del Yoduro de Propidio (YP) (Ex/Em 483/503), que permite identificar la viabilidad de las células al unirse selectivamente a los ácidos nucleicos, tanto del núcleo como de las mitocondrias. El SYTO9 pertenece a la familia de las cianinas, las cuales tienen una gran afinidad por los ácidos nucleicos y el espectro de absorción-emisión de luz abarcan gran parte del espectro visible. Además, estos fluoróforos muestran grandes diferencias de permeabilidad y especificidad que las hacen compatibles con diferentes tipos de metodologías. El SYTO9 tiene la capacidad de permear por la membrana íntegra uniéndose entre un par de bases, por lo que se conoce como un intercalador y las células fluorescerán de color verde (Thermo Fisher Scientific, 2010). La concentración en la que se utiliza este fluoróforo puede favorecer que interaccioné una molécula con otras formándose oligómeros, por lo que la forma de interaccionar con el ácido nucleico cambia e interacciona con las pares de bases que se encuentran en el surco menor de la doble hélice (Sovenihazy *et al.*, 2003). Este fluoróforo es capaz de permear por la membrana tanto de las células eucariotas como procariotas.

Por otro lado, el YP no es capaz de atravesar la membrana por lo que solo interaccionará con los ácidos nucleicos si la membrana tiene algún daño estructural. Debido a su mayor afinidad a los ácidos nucleicos, alrededor de 40 veces en

comparación con el SYTO9, este fluoróforo desplaza al SYTO9 y las células fluorescerán de color rojo y se consideraran no viables. Es posible que ambos fluoróforos queden unidos al material genético, y la fluorescencia emitida sea de color amarillo, debido a que la emisión del YP domina sobre la emisión del SYTO9 (Thermo Fisher Scientific, 2010).

### **2.6.2. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)**

En los últimos años la técnica FISH ha mostrado ser eficiente para la identificación y detección de microorganismos en muestras ambientales complejas o en condiciones controladas dentro de laboratorio. Por lo que esta técnica se ha convertido en un método estándar para el estudio de la composición, crecimiento y desarrollo de los microorganismos en ambientes complejos como las comunidades microbianas y dentro de las biopelículas (Rohde *et al.* 2015). Desde su desarrollo en la década de los 90, por Amann *et al.* (1990) y DeLong *et al.* (1989), el protocolo no ha sufrido cambios importantes dentro de la metodología, la cual consta de un paso de fijación de la muestra, la permeabilización de las membranas, la hibridación, la remoción de los residuos y la visualización de las células mediante microscopía fluorescente. Todas las etapas de esta técnica han sido mejoradas, pero sin duda la hibridación es una de las que más atención ha tenido, ya que generalmente se requiere de una optimización. Para esta optimización los factores con mayor importancia son el tiempo y la temperatura de hibridación, el tiempo de hibridación toma en cuenta desde la penetración de la sonda a través de la membrana celular hasta la interacción de la sonda con la secuencia complementaria. Por otro lado, la temperatura de hibridación se ve afectada por la cantidad de interacciones (puentes de hidrógeno) que estabilizan la doble cadena de nucleótidos y la afinidad de la sonda utilizada con la secuencia complementaria. La formamida es un compuesto que ayuda a la optimización de estos dos factores ya que es un desnaturalizante que hace accesible la secuencia complementaria y estabiliza la interacción entre

esta y la sonda, con lo que disminuye la temperatura y tiempo de hibridación. Las sondas utilizadas para esta hibridación son secuencias específicas del gen 16S rRNA para el caso de las bacterias y del gen 23S rRNA para las levaduras, estos genes tienen zonas conservadas y zonas variables que permiten el diseño de sondas universales para los tres reinos o tan específicas como para reconocer género y especie (Amann *et al* 1990; Santos *et al.* 2014).

## 2.7. Espectroscopia Raman

La espectroscopía de Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de cualquier compuesto orgánico o inorgánico, permitiendo la identificación de este material. Este análisis espectroscópico se basa en la detección de la luz dispersa proveniente de un material al ser expuesto a un haz de luz monocromático. La mayor parte es dispersada con la misma frecuencia que la luz incidente (dispersión Rayleigh), mientras que una pequeña fracción es dispersada inelásticamente sufriendo un ligero cambio de frecuencia (dispersión Raman), la cual es específica para cada material, debido a los movimientos de rotación y vibración dentro de éste (Maquelin *et al.* 2002). La dispersión Raman puede dividirse en dos interacciones, la Raman Stokes ( $\nu_0 - \nu_r$ ) es cuando el fotón dispersado tiene una frecuencia menor al incidente, mientras que la dispersión Raman anti-Stokes ( $\nu_0 + \nu_r$ ), es cuando el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor al incidente. Cada material tendrá un conjunto característico de  $\nu_r$ , el cual es integrado por el espectro Raman, mostrándolos en un gráfico donde el eje de las abscisas es el desplazamiento de las frecuencias Raman respecto a la frecuencia incidente y en el eje de las ordenadas la intensidad de la señal (Stiles *et al.* 2008). Dos de las principales ventajas de este método es que el material analizado no requiere de un pretratamiento para realizar el análisis, además de que puede utilizarse en muestras líquidas, gaseosas o sólidas sin perder efectividad. Otra ventaja de la espectroscopía Raman es que este análisis permite la identificación de la muestra sin destruirla (El-Abassy *et al.* 2011; Mazurek *et al.*

2015). Es por esto que se considera que la espectroscopia Raman es una técnica analítica potente y que se adapta a las necesidades de la investigación y posibles campos de aplicación, como la industria alimentaria, medio ambiente, petroquímica, aplicaciones biomédicas, entre otras (Blanpain-Avent *et al.* 2012)

### 3. JUSTIFICACIÓN

La leche posee un elevado contenido de nutrientes, por lo que es capaz de soportar el desarrollo de microorganismos de distinta naturaleza. Debido al deterioro químico de los nutrientes y a las condiciones de procesamiento de la leche cruda, existe el riesgo de formación de depósitos de materia orgánica o minerales sobre las superficies de los equipos con las que está en contacto directo, las cuales generalmente son de acero inoxidable. Estos depósitos actúan como preacondicionamiento, favoreciendo la adhesión de microorganismos y la posible formación de biopelículas, lo que representa un peligro de contaminación persistente y compromete la inocuidad de los alimentos procesados en estos equipos.

Es importante conocer la dinámica de formación de los depósitos, así como los factores que intervienen en su desarrollo (temperatura, velocidad de flujo, tipo de fluido, entre otros), y las interacciones con la superficie que pudieran dificultar su remoción, para diseñar estrategias de limpieza y desinfección efectivas que ayuden a disminuir la formación de estos depósitos y de las biopelículas. El uso de técnicas espectrométricas y de análisis de superficie permite determinar qué tan favorecida será la formación de enlaces e interacciones entre las macromoléculas, los minerales y los microorganismos con la superficie, así como la fuerza de estas uniones. Adicionalmente, el análisis de los cambios en la comunidad microbiana presente en las biopelículas, permite identificar especies resistentes al proceso de limpieza y desinfección.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los cambios fisicoquímicos y el aumento de la rugosidad superficial ocasionada por la presencia del ensuciamiento con leche cruda sobre el acero inoxidable 304-2B o acero electropulido, favorecen la adhesión de la microbiota asociada a la leche cruda y la formación de biopelículas.

## **5. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar los cambios superficiales del acero 304-2B y del acero electropulido, ocasionados por la presencia de los depósitos (tipo A y B), y su influencia en la formación de las biopelículas formadas por la microbiota presente en la leche cruda.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Diseñar un dispositivo para formar los depósitos A y B sobre placas de acero inoxidable, simulando las condiciones dinámicas en el procesamiento de la leche en la industria láctea.
2. Establecer un modelo de formación de depósitos tipo A y B, así como de formación de biopelículas sobre placas de acero inoxidable tipo 304 y acero electropulido, utilizando leche cruda.
3. Determinar la dinámica de formación del bioensuciamiento mediante la identificación de los componentes y la interacción con la superficie inerte utilizando espectroscopía de Raman y técnicas de microscopía.
4. Identificar la comunidad bacteriana de las biopelículas su dinámica, y la interacción con los componentes de los depósitos.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Material biológico**

Durante este trabajo se utilizó leche cruda de vaca, obtenida de un mercado local, a esta leche se le realizaron determinaciones de proteínas y minerales, las cuales sirvieron como control para poder realizar un seguimiento en la concentración de estos componentes antes y después de la formación de los depósitos.

Para la formación de biopelículas se utilizó leche cruda, para favorecer la adhesión de la microbiota presente y la posible formación de las biopelículas.

### **6.2. Placas de acero inoxidable**

En este estudio se utilizaron placas de acero inoxidable del tipo 304 con acabado 2B, las cuales fueron obtenidas de un distribuidor local de acero. La rugosidad promedio de estas placas es de 32.7 nm, y el tamaño de las placas utilizadas fue de 2.54 cm por lado (6.5 cm<sup>2</sup> de área).

Antes de cada uso las placas recibieron un lavado, el cual constó de tres pasos: 1) lavado por inmersión en detergente a 65°C durante 5 min.; 2) enjuague con agua destilada a las mismas condiciones; y 3) un enjuague con 15 mL de agua destilada a temperatura ambiente (Rosmaninho *et al.*, 2007). Después de este lavado las placas de acero fueron esterilizadas por calor seco a 180°C durante 2 h.

### **6.3. Formación de bioensuciamiento sobre las placas de acero**

#### **6.3.1. Formación de depósitos tipo A**

Para la formación de este tipo de depósitos se siguió la metodología descrita por Rosmaninho *et al.*, (2008) y por Fickak *et al.*, (2011), quienes plantean un precalentamiento de 100 mL de leche a 70°C por 15 min, para favorecer la desnaturalización y agregación de las proteínas de la leche y la adhesión de las mismas a la superficie por el aumento de las posibles interacciones. Después de realizar el precalentamiento se introdujo una placa de acero 304 con acabado 2B,

de 6.25 cm<sup>2</sup> (2.54 x 2.54 cm por lado) y de peso conocido. Se elevó la temperatura de la leche hasta 90°C y se mantuvo durante 30 min, después de este tiempo se secó la placa hasta peso constante para determinar por diferencia el peso de los depósitos de materia orgánica adheridos a la superficie.

Para determinar la cantidad de proteínas y minerales adheridos se realizó un lavado con 10 mL de una solución de ácido fosfórico al 1% (V/v) a 50°C, durante 30 min; posteriormente se realizó un lavado con una solución de NaOH al 1% (P/p), a las mismas condiciones. Estas soluciones (ácida y alcalina) se mezclaron y se realizó la determinación de minerales (cenizas totales, AOAC 2005) y proteínas (método Bradford) para la determinación de la composición del ensuciamiento sobre las placas (Boxler *et al.*, 2014).

### **6.3.2. Formación de depósitos tipo B**

Para la formación de estos depósitos se siguió la misma metodología que en la formación de los depósitos tipo A, con la diferencia de que el calentamiento posterior al pretratamiento se realizó a 121°C por 5 min. Las determinaciones de proteínas y minerales se realizaron como en el caso de los depósitos tipo A.

### **6.3.3. Formación de biopelículas**

La formación de las biopelículas se realizó favoreciendo la adhesión de las bacterias presentes en la leche cruda, sobre placas de acero tipo 304-2B. Para lo cual se colocaron placas estériles de acero inoxidable en un contenedor de cierre hermético, bajo condiciones asépticas. Cada placa se inoculó con 100 µL de leche cruda. El contenedor se incubó a 37°C por 5 días, con una humedad relativa superior a 90%. Cada día se realizó un lavado con 10 mL de amortiguador de fosfatos (pH 7, 50 mM), para retirar las células no adheridas a la superficie. Después del enjuague se colocó la placa en el mismo contenedor y se inoculó con el mismo volumen de leche estéril para favorecer la maduración de las biopelículas y renovar el medio de cultivo.

La recuperación de las células adheridas sobre la superficie se realizó al quinto día, para lo cual se introdujo la placa de acero a un tubo cónico de 50 mL con 10 mL de amortiguador de fosfatos y se agitó en el vortex durante 2.5 min a velocidad máxima. Para cuantificar el número de células recuperadas se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina 0.85% (p/v) (SS). Con estas diluciones se inocularon diferentes medios de cultivo, los cuales fueron (Caixeta *et al.*, 2012):

- Cuenta total: Agar nutritivo (AN), a 30 °C durante 24 a 48 h para los microorganismos mesófilos aerobios;
- Bacterias ácido lácticas: Agar de Man, Rogosa y Sharp (MRS), a 37°C durante 48 h;
- Hongos y levaduras: Agar papa-dextrosa (PDA), a 30°C durante 48 a 72 h;
- Microorganismos patógenos: Se determinó la presencia del género *Listeria* sp., con el uso del agar selectivo para este género de microorganismos, agar Oxford, sin un paso de enriquecimiento en un medio nutritivo.

#### **6.4. Caracterización superficial de las placas de acero sin y con depósitos**

##### **6.4.1. Determinación de la energía libre superficial del acero inoxidable**

La energía libre de la superficie del acero inoxidable con y sin depósitos se evaluó a través de la medición del ángulo de contacto formado por un líquido, de tensión superficial conocida, y la superficie de las placas de acero inoxidable, según el modelo de Owens–Wendt–Rabel–Kaelble (OWRK) (Owens y Wendt 1969; Kaelble 1970). Estos autores mencionan que la energía libre superficial (ELS) de un material dado se puede calcular a través de los componentes de la tensión superficial de las entidades que interactúan, de acuerdo con la ecuación de Young (Ec. 1):

$$\gamma_s - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos \theta \quad (1)$$

Donde  $\gamma_s$  es la tensión superficial de la superficie o ELS,  $\gamma_{SL}$  es la tensión superficial de la interface solido-líquido,  $\gamma_{LV}$  es la tensión superficial de la interface líquido-vapor y  $\theta$  es el ángulo de contacto del líquido sobre la superficie. En algunos casos la tensión superficial y la ELS se puede dividir en dos componentes, los cuales son las fuerzas de dispersión o fuerzas de Van der Waals, las otras fuerzas son las interacciones polares (dipolo-dipolo, puentes de hidrogeno, entre otras), esta interacción se puede expresar como la Ec. (2).

$$\gamma_T = \gamma^D + \gamma^P \quad (2)$$

Donde  $\gamma_T$  es la ELS total,  $\gamma^D$  es la tensión superficial de fase dispersa y  $\gamma^P$  es la tensión superficial de la fase polar. Tomando esta consideración el modelo OWRK plantea una ecuación lineal donde la pendiente y la ordenada al origen están dadas por la raíz cuadrada de las fases dispersa y polar de la ELS (Cappelletti *et al.*, 2013) (Ec. 3):

$$\frac{\gamma_{LV} (1 + \cos \theta)}{2\sqrt{\gamma_{LV}^D}} = \sqrt{\gamma_s^P} \sqrt{\frac{\gamma_{LV}^P}{\gamma_{LV}^D}} + \sqrt{\gamma_s^D} \quad (3)$$

#### 6.4.2. Determinación del ángulo de contacto

Para determinar el ángulo de contacto se utilizaron tres líquidos de referencia (agua desionizada, etilenglicol y glicerol), además de la leche cruda. Se utilizó un analizador de gota (DSA30, KRÜSS, Alemania) para colocar una gota de 7  $\mu$ L del líquido correspondiente sobre la superficie de la placa de acero inoxidable, previamente limpio y desengrasado, a los 60 s se realizó la medición del ángulo de contacto con el software “DSA4” (KRÜSS, V1.1-02).

#### **6.4.3. Rugosidad superficial**

Se determinó la rugosidad a nivel macrométrico, mediante un perfilómetro (Veeco, Dektak 6M, EUA), de las placas de acero 304-2B o acero electropulido, con y sin depósitos adheridos a la superficie, para lo cual se colocó una placa sobre la platina del equipo y se determinó la rugosidad a lo largo de una línea sobre la superficie (2 cm aprox.), mediante el software Dektak 6M (V.8.30.005) se obtuvo la rugosidad media (Ra y rugosidad media cuadrática (Rms)).

#### **6.4.4. Espesor de los depósitos**

Se determinó el espesor de los depósitos tipo A y B, formados sobre la superficie de las placas de acero. Para determinar el espesor se colocó la placa con depósitos de proteínas o minerales, el cantiléver del perfilómetro se calibró para hacer un recorrido de alrededor de 1 cm dejando el escalón del espesor de los depósitos a la mitad de esta distancia. Para tomar la medición se descartó el primer pico por representar el salto del cantiléver al hacer contacto con el espesor del recubrimiento. La medición que se tomó fue la de la zona más estable del gráfico.

#### **6.4.5. Análisis elemental de los depósitos tipo A o B**

Se analizó la composición elemental de los depósitos tipo A o B, formados en la superficie de las placas de acero para comparar la composición de estos depósitos con la composición obtenida en el análisis por técnicas generales para proteínas (Bradford) y minerales (cenizas totales), detallados en el apartado 6.3.1. El análisis se realizó en un espectrómetro secuencial de rayos X (Lab Center XRF-1800, Shimadzu, Japon). Los elementos que se analizaron fueron: níquel, cromo y hierro como componentes principales del acero; carbono, oxígeno y nitrógeno como componente de las proteínas; y fósforo y calcio como componentes de los minerales.

## **6.5. Determinación de comunidades microbianas en las biopelículas mediante técnicas de microscopia y métodos moleculares**

Se utilizaron los estudios moleculares y espectrométricos para analizar la composición de los depósitos de materia orgánica, así como la composición las biopelículas y los cambios en las comunidades bacterianas presentes en las mismas, además de describir los cambios con respecto al tiempo de maduración.

### **6.5.1. Viabilidad celular dentro de las biopelículas**

Para identificar la viabilidad de las células presentes dentro de la matriz extracelular se utilizó una mezcla de los fluoróforos SYTO9 y yoduro de propidio (PI), que permite identificar la viabilidad de las células. Estos compuestos hacen fluorescer de color verde (SYTO9) las células que tienen la membrana íntegra, mientras que las células que tengan la membrana dañada fluorescerán de color rojo (PI).

Para esta tinción se utilizaron placas de acero que presentaban la formación de depósitos tipo A o B, además de la formación de la biopelícula formada por la microbiota de la leche cruda.

Los tubos que contienen los fluoróforos se centrifugaron (2 min, 2000 rpm) para que todo el contenido se fuera hasta el fondo. A cada tubo se le adicionaron 300  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) y se agitó para mezclar. Esta mezcla se almacenó en oscuridad a -20 °C.

Para realizar la tinción de trabajo se descongelaron los tubos de los fluoróforos y se mezclaron 1.5  $\mu$ L de cada fluoróforo y se adicionaron 1000  $\mu$ L de agua destilada estéril, la proporción de esta mezcla es 1.5:1.5:1000  $\mu$ L, SYTO9:PI:Agua.

Después de lavar las placas de acero con amortiguador de fosfatos al quinto día de formación de las biopelículas se cubrió la superficie con 100  $\mu$ L de la mezcla de fluoróforos y se introdujo la placa en un tubo de 50 mL que contenía una

tira de papel filtro humedecido en solución salina (NaCl) 4 M, para mantener la humedad dentro del tubo. Este tubo se cubrió con aluminio para proteger la placa de la luz y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente.

Una vez pasado el tiempo de incubación se colocó un cubreobjetos en la superficie de la placa y se observó en el microscopio de fluorescencia (Wang *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015).

### **6.5.2. Microscopía FISH**

Para realizar la técnica molecular FISH se preparó las biopelículas de la forma que se ha descrito en los apartados anteriores. Una vez establecida la biopelícula se fijaron las células sumergiendo las placas en una solución de formaldehído al 3.7% en amortiguador salino de fosfatos (PBS, pH 7.2), esta solución se mantuvo a 4 °C por 12 h, después de este tiempo se realizaron 2 lavados con PBS. Después de este tiempo se deshidrataron las células con baños sucesivos de etanol a diferentes concentraciones (50, 80 y 95% v/v), durante 3 min cada uno, las placas se secaron.

Las sondas utilizadas para la hibridación se encontraron en la base de datos probeBase (Universidad de Viena, Austria), estas sondas se muestran en el Cuadro 5. Las sondas EUB 338, Strc493 y Lis-637 hibridan una secuencia específica del gen 16S rRNA de bacterias, mientras que la sonda PF2 reconoce una secuencia del gen 18S rRNA de levaduras, estas sondas han sido utilizadas para esta técnica y han mostrado una alta especificidad (Amann *et al.* 1990; Franks *et al.* 1998; Kempf *et al.* 2000, Shmid *et al.* 2003).

Para la elección de los fluoróforos es importante tomar en cuenta la longitud de onda a la cual absorben y emiten la energía, ya que estas pueden traslaparse y afectar la observación, dificultando la diferenciación de los tipos de microorganismos presentes en las biopelículas. Los fluoróforos utilizados para esta técnica fueron la fluoresceína, el cual se excita a 495 y emite 520 nm, estas

longitudes de onda se encuentran en la zona verde del espectro visible, el Cy3 se excita a 550 y emite a 564 nm, estas longitudes se encuentran en la frontera del verde-amarillo del espectro. El Rojo Texas® se excita a 598 y emite a 617 nm, tiene fluorescencia roja. En todos los casos el fluoróforo correspondiente está unido al extremo 5' de la sonda.

**Cuadro 2:** Sondas utilizadas para la técnica FISH

Sonda	EUB338	PF2	Strc493	Lis-637
<b>Especificidad</b>	90% de las bacterias	Todas las levaduras	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp.	<i>Listeria</i> spp, excepto <i>L. grayi</i>
<b>Gen objetivo</b>	16S rRNA	18S rRNA	16S rRNA	16S rRNA
<b>Posición</b>	338-355	618-636	493 - 511	637 - 657
<b>Secuencia</b>	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'	5'- CTC TGG CTT CAC CCT ATT C -3'	5'- GTT AGC CGT CCC TTT CTG G -3'	5'- CAC TCC AGT CTT CCA GTT TCC -3'
<b>Fluoróforo</b>	Fluoresceína	Rojo Texas	Cy3	Fluoresceína

Amann *et al.* 1990; Franks *et al.* 1998; Kempf *et al.* 2000, Shmid *et al.* 2003

Se preparó una dilución 1:8 de cada sonda, por separado, con el amortiguador de hibridación [NaCl 0.9 M, Tris 0.1 M, (pH 7.2), SDS 0.1% (p/v)] y se incubó durante 2 h a 46 °C. Después del tiempo de hibridación se realizó un lavado con solución de Oether [NaCl 4 M, Tris 0.1 M (pH 8.0), EDTA 0.5 M, SDS 10% (p/v)] a 46 °C, se secó la preparación y se observó en un microscopio de fluorescencia (ZeissAxioskope 40, FICT Filter, longitud de onda de observación >530 nm) (Arevalos-Sánchez *et al.* 2012).

### **6.5.3. Caracterización molecular de los microorganismos en la biopelícula**

#### **6.5.3.1. Extracción de ADN genómico**

Para realizar la extracción del DNA total se recuperó el material genético de las biopelículas formadas sobre las placas de acero con depósitos tipo A o B, mediante la técnica de frotación con hisopo. Este hisopo se introdujo en un tubo con 3 mL de amortiguador de fosfatos, se agitó en el vortex durante 2.5 min., para resuspender los microorganismos. Este volumen se centrifugó durante 5 min a 6000 rpm, el pellet se lavó con 1 mL de agua estéril. Se utilizó el kit PowerSoil DNA Isolation kit, de MOBIO, con las siguientes modificaciones en el proceso de lisis. El tubo Power Bead con la muestra se incubó durante 5 min a 70°C, posteriormente este tubo se agitó 1 min en posición horizontal en el vortex a máxima velocidad, después de este tiempo el tubo se incubó 5 min a 70°C y se pasó a un baño de hielo (4°C), durante 5 min. La calidad e integridad del ADN se determinó en gel de agarosa al 1%, la concentración se determinó con un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Este procedimiento se realizó a diferentes tiempos de maduración (1, 3 y 5 días), de las biopelículas formadas sobre las placas de acero.

#### **6.5.3.2. Amplificación del gen 16S rRNA de bacterias y del gen 26S RNA de levaduras**

Para amplificar la secuencia variable del gen 16S rRNA que permite la identificación de las bacterias, se realizó una PCR anidado. Como plantilla para la primera ronda se utilizó el ADN total extraído de las biopelículas, los iniciadores utilizados fueron el 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'), las condiciones de la reacción fueron 94°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 60 s, 45°C por 60 s, 72°C por 1 min; y finalmente 72°C por 10 min. Para realizar la segunda ronda se utilizaron los iniciadores 357F-GC (5'-GC-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') (este primer cuenta con la secuencia de GC para facilitar la separación de las secuencias en el gel de poliacrilamida y aumentar

la resolución), y 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'), estos iniciadores amplifican las regiones V3-V5 del gen 16S rRNA, la cual es una región variable dentro del gen que permite la identificación de los microorganismos presentes en la muestra (Cisneros-Pérez *et al.* 2015). Las condiciones para la PCR fueron: 96°C, 4 min; 10x (94°C, 30 s; 61°C, 1 min, en cada ciclo se disminuyó 1°C hasta 56°C, a esta temperatura se realizaron 20 ciclos más); 72°C, 1 min. El gel de agarosa se corrió con la misma proporción de DNA y amortiguador, con una intensidad de corriente de voltaje de 70 V y el tiempo de corrida fue de 40 min. La mezcla de las reacciones se muestra en el Cuadro 3.

**Cuadro 3:** Mezcla de las reacciones de PCR

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Agua	18.4 µL
Amortiguador de carga (10x)	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50x)	1.5 µL
dNTPs (10 µM)	0.5 µL
Oligo 1 (10 µM)	0.5 µL
Oligo 2 (10 µM)	0.5 µL
Taq (5 u/µL)	0.1 µL
DNA molde	1 µL

Para la amplificación del ADN de las levaduras se utilizaron los iniciadores NL1F (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4R (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), ubicados en el dominio D1/D2 del gen 26S rRNA de las levaduras. Las condiciones para esta primera ronda de PCR fueron: 95°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 2 min; finalmente 72°C por 10 min. Para la segunda ronda se utilizaron los iniciadores NL1F con la secuencia de GC. El otro iniciador utilizado fue el LS2R (5'-

ATTCCCAAACAACACTCGACTC-3'), bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5 min; 30 ciclos de 95°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 2 min; finalmente 72°C por 7 min. Para confirmar la amplificación se realizó un gel de agarosa al 1%, durante 40 minutos con una intensidad de corriente de 70V (Cocolin *et al.* 2002).

### **6.5.3.3. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)**

DGGE se realizó en el Dcode Universal Mutation Detection System (Biorad, Hercules, California, EE.UU.). Los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida al 8% (1 mm de espesor) en 0,5x amortiguador TAE con un gradiente de desnaturalización lineal (urea-formamida) de 30% a 60%. La electroforesis se llevó a cabo a 60°C a un voltaje constante de 70 V durante 16 h. Se observaron las bandas de gel a la luz visible, y se tomó una foto con una cámara digital. La imagen de DGGE se analizó con el software Quantity One (Bio-Rad), para generar una matriz con la intensidad del pico para cada banda detectada. El término abundancia relativa se refiere a la relación entre la intensidad de cada banda con respecto a la intensidad total. La distancia ecológica entre las muestras se calculó utilizando el índice de Bray-Curtis y un agrupamiento jerárquico de aglomeración por el método del grupo de pares no ponderados con la media aritmética (UPGMA) (Carrillo-Reyes 2014; Cisneros-Pérez *et al.* 2015). Los análisis se realizaron usando el software "R", usando el paquete de "clúster". Con el fin de eluir el ADN de las bandas dominantes que se cortaron del gel de acrilamida se sumergieron por separado en 20 µl de agua desionizada, y en seguida se aplicó un proceso de congelación y descongelación (-20 °C durante 2 h y luego 60 °C durante 30 min, tres veces) antes de almacenarlos durante 72 h a 4 °C. Para purificar el ADN eluído se utilizó una columna de afinidad y se realizaron lavados con etanol al 70%. El ADN se eluyó con 12 µl de agua destilada estéril y se almacenó a -20 °C. La secuenciación de los amplicones se realizó en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del IPICYT.

## **6.6. Espectroscopía Raman**

Este análisis se realizó para determinar las posibles interacciones presentes sobre la superficie de las placas de acero 304-2B o electropulido, que pudieran favorecer la adhesión tanto de otras moléculas de materia orgánica o minerales, como de los microorganismos presentes en la leche cruda. El análisis Raman sobre las placas de acero 304-2B o electropulido, sin y con depósitos tipo A o B, se realizó utilizando un espectrómetro Raman (DRX780, Thermo Scientific, EUA), acoplado a un láser de 14mW a  $780\pm 0.2$  nm. La potencia utilizada para el análisis fue de 14 mW con una apertura de 50  $\mu\text{m}$  y el rango de longitud de onda fue de 3000 a  $100\text{ cm}^{-1}$ . El análisis de los espectros fue con el programa OMNIC™ Specta (versión 1.0.1591, Thermo Scientific).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Formación de depósitos de proteínas y minerales sobre la superficie de acero inoxidable.

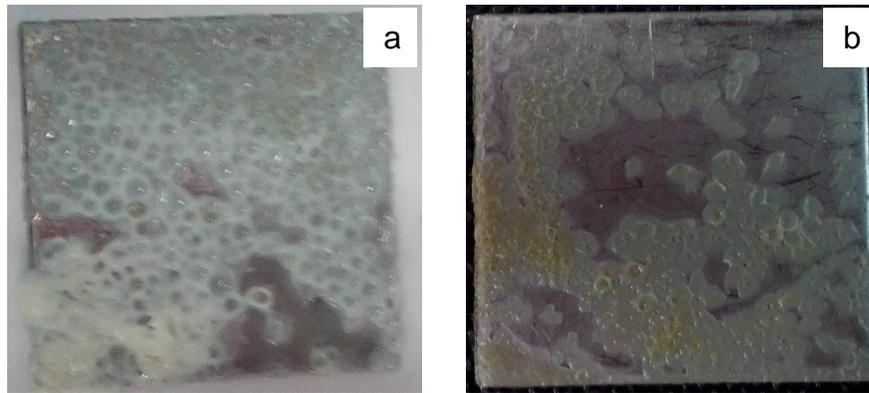
Dentro de las proteínas presentes en la leche la que tiene una mayor importancia en la formación de depósitos es la  $\beta$ -lactoglobulina, ya que es muy termolábil por lo que al desnaturalizarse puede interactuar con los otros componentes de la leche, formando agregados que posteriormente precipitan y forman los depósitos o interaccionan directamente con la superficie, formando una primera capa que aumenta el número de las posibles interacciones, favoreciendo que se formen capas subsecuentes sobre esta superficie. Algunos autores han descrito que los depósitos tipo A están constituidos por proteínas (50-70%), minerales (30 y 40%) y grasa (4-8%) (Blanpain-Avet *et al.*, 2011). Las composiciones de los depósitos formados sobre las placas se muestran en el Cuadro 4, donde se observa que hay una proporción promedio de  $48.4 \pm 3.5$  % (p/p) de proteínas,  $44.2 \pm 6.6$  % (p/p) de cenizas y  $7.7 \pm 6.1$  % (p/p) de otros componentes (grasa, carbohidratos, ente otros). Estos resultados concuerdan con los reportes ya que se observa que las proteínas se encuentran en una mayor proporción que los minerales, en comparación con el contenido de minerales. La apariencia de estos depósitos (Figura 5), coinciden con los describen algunos autores (Blanpain-Avet *et al.*, 2011; Jimenez *et al.* 2013), ya que son blancos, suaves y esponjosos, debido a la agregación de las proteínas desnaturalizadas y la formación de un gel, dentro del cual quedan atrapados los minerales de la leche (Young-Min *et al.*, 2012).

La composición de los depósitos tipo B formados sobre la superficie se muestran en el Cuadro 4, se puede observar que a diferencia de los depósitos tipo A, la concentración de minerales es mayor en comparación con la de las proteínas, la concentración de minerales en estos depósitos es de  $72.6 \pm 3.3$ % (p/p) y las proteínas se encuentran en una concentración  $27.2 \pm 3.8$ % (p/p), esta concentración está de acuerdo con las proporciones que describieron Blanpain-Avet *et al.* (2011) (70 - 80 % para minerales y 15 % para las proteínas).

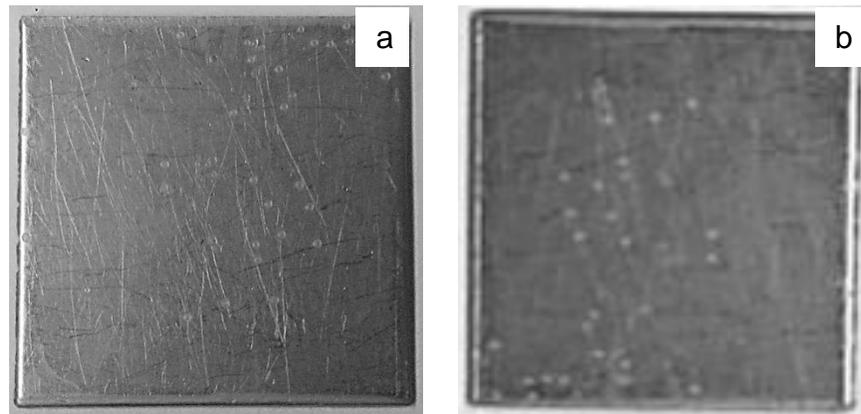
**Cuadro 4:** Composición de los depósitos tipo A y B, utilizando leche cruda

Depósitos	Proteínas (%)	Minerales (%)	Otros (%)
Tipo A (304-2B)	48 ± 3.5 a	44 ± 6.6 b	7 ± 0.6 b
Tipo B (304-2B)	27 ± 3.6 b	72 ± 3.3 a	--
Tipo A (electropulido)	55 ± 4.7 a	35 ± 3.0 b	10 ± 1.7 c
Tipo B (electropulido)	28 ± 1.2 b	70 ± 1.2 a	--

Parámetros dentro de cada columna con diferente letra indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )



**Figura 4:** Depósitos tipo A (proteínas), formados por leche cruda sobre placas de acero (2.54x2.54cm de lado). a) depósitos después de 30 min de calentamiento a 90°C con leche cruda; b) depósitos con 24 h de secado a 70°C.



**Figura 5:** Depósitos tipo B (minerales), formados por leche cruda sobre placas de acero (2.54x2.54cm de lado). a) depósitos con leche cruda después de 5 min de calentamiento a 121°C; b) depósitos con 24 h de secado a 70°C.

En el Cuadro 4 se observa que ambos depósitos coinciden con lo reportado ya que el componente mayoritario de los depósitos tipo A son las proteínas ( $55 \pm 4.7 \%$ ) y de los depósitos tipo B son los minerales ( $70 \pm 1.2 \%$ ).

#### **7.1.1. Análisis elemental de los depósitos formados en la superficie de las placas.**

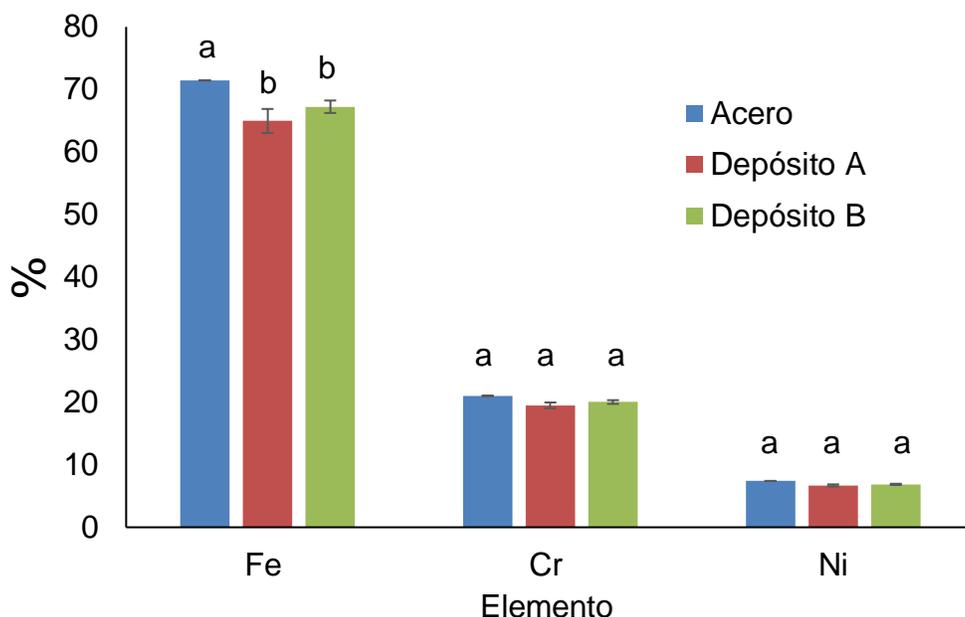
Se realizó el análisis elemental de los depósitos formados en la superficie de las placas de acero inoxidable mediante un analizador de fluorescencia de rayos X. En las placas de acero inoxidable y en las que presentaban la formación de los depósitos se analizó la presencia de los elementos característicos para cada material, por lo que para el acero inoxidable se analizó níquel, hierro y cromo; para las proteínas se analizó nitrógeno, oxígeno y carbono; y para los minerales se analizó fósforo y calcio. En la Figura 6 se observan los resultados obtenidos para el análisis de los elementos propios del acero inoxidable, se observa que el componente mayoritario es el hierro, seguido del cromo y del níquel. Estos resultados corresponden con la composición del acero inoxidable 304 mencionada en la norma A276-06 de la ASTM. Para este tipo de acero el contenido de hierro es de 70 % (p/p) aproximadamente, mientras que el cromo y níquel se encuentran en 18 % (p/p) y 8 % (p/p), respectivamente, además de otros elementos como el manganeso, azufre y silicio. Esta norma también especifica que el carbono se puede encontrar como máximo en 0.08% (p/p). La razón por la cual no se reporta la presencia de este elemento en las placas de acero es porque el análisis que realiza el equipo es puntual y su poder de penetración es muy bajo, es decir que no alcanza a analizar las capas que se encuentran hacia el interior del sustrato, por otro lado, la presencia de una capa de óxido de cromo en la superficie dificulta la penetración de los rayos X, por lo que no es posible detectar el carbono (Steiner y Mandrino 2016).

En la Figura 6 se muestran los elementos analizados en las placas que presentaban formación de depósitos sobre la superficie. En esta figura se observa que los elementos mayoritarios de los depósitos (proteínas y minerales) solo se encuentran en presencia de los depósitos y no en las placas de acero inoxidable. Esto permitió descartar que los elementos propios del acero, puedan causar una sobreestimación de los elementos analizados en los depósitos. Para los elementos mayoritarios en las proteínas (carbono, oxígeno y nitrógeno) no se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los depósitos tipo A y B, esto puede deberse a que estos elementos se encuentran formando una capa uniforme sobre la superficie del acero inoxidable y el análisis puntual no mostró una diferencia entre los puntos bajo estudio (Cui *et al.* 2016). Los minerales analizados (fosforo y calcio) sí presentan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), en cuanto a la concentración entre los depósitos A y B, estos resultados concuerdan con la composición reportada en el apartado anterior. En el Cuadro 4 se observa que los depósitos tipo B tienen una concentración de minerales 1.5 veces mayor en comparación con los depósitos tipo A y en la Figura 7 se muestran los depósitos tipo B, lo cuales tienen una concentración relativa mayor de minerales que los depósitos tipo A. Estos resultados pueden deberse a que el análisis puntual se orientó hacia un depósito de minerales por lo que el área analizada presentaba una concentración de minerales representativa a estos depósitos (Jastrzębska *et al.* 2003).

El no encontrar señales de los elementos característicos de la materia orgánica (carbono, oxígeno y nitrógeno) en las placas de acero indica que la composición de la superficie del acero no interfiere en el análisis elemental de los depósitos, por lo que no se presenta una sobreestimación de estos elementos. Por otro lado, el que no exista una variación en estos compuestos (C, O y N), para ambos tipos de ensuciamiento indica la presencia de residuos de proteínas o ácidos grasos o algún otro componente presente en la leche que esté constituido por estos elementos. En el Cuadro 4 se observa que tanto en los depósitos tipo A como en

los tipos B, la concentración de proteínas es considerable, para ambos aceros, confirmando los resultados obtenidos (Babos *et al.* 2018).

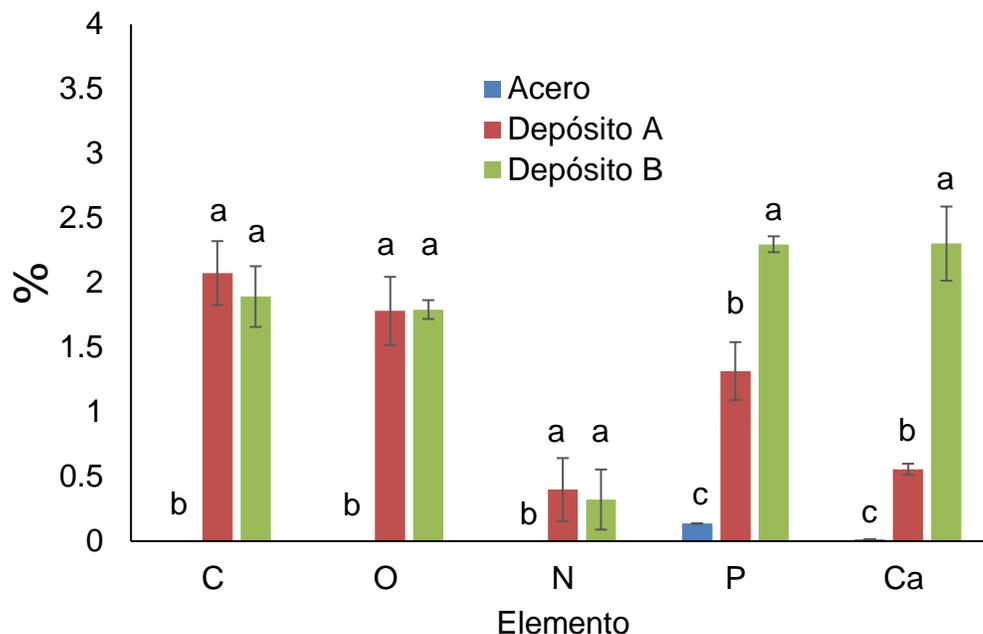
Otro resultado interesante en este análisis elemental, es la diferencia en la concentración de calcio presente en los depósitos tipo B. Esta concentración es casi tres veces mayor en comparación con tipo A, lo que puede deberse a que la materia orgánica es más sensible al tratamiento térmico, en comparación con los minerales presentes. Después del tratamiento térmico los residuos de materia orgánica se desnaturalizan y dejan más expuestos los minerales, que pueden ser detectados por los rayos X del equipo (Stankey *et al.* 2015).



**Figura 6:** Componentes del acero inoxidable analizados en las placas de acero inoxidable tipo 304.

Hayrapetyan *et al.* (2015), demostraron que las cepas de *B. cereus* (ATCC14579 y ATCC 10987), además de algunas cepas aisladas de alimentos (23 cepas), tuvieron un desarrollo mayor cuando la superficie fue acero inoxidable, en comparación con poliestireno. Estos autores concluyen que existe una correlación entre el número de células presentes en las biopelículas y la composición y

características de la superficie con la que están en contacto, además de otros factores ambientales.



**Figura 7:** Componentes mayoritarios de las proteínas (C, O y N) y minerales (P y Ca), analizados en la superficie de las placas de acero inoxidable tipo 304.

## 7.2. Caracterización superficial de las placas de acero sin y con depósitos

### 7.2.1. Determinación del ángulo de contacto

La medición del ángulo de contacto entre un líquido y una superficie permite determinar si este líquido es capaz de mojar la superficie con la que está en contacto. Esta capacidad de mojar una superficie es el resultado de la suma de fuerzas de tensión superficial del líquido y la energía libre superficial del sólido. En términos generales entre más pequeño sea el ángulo de contacto mayor será la interacción del líquido con la superficie, es decir la superficie será hidrofílica, por el contrario, si el ángulo de contacto es superior a los 90° la interacción entre el líquido y la superficie será menor, por lo que la superficie se considerará hidrófoba. En el

Cuadro 5 se observa que el acero puede considerarse una superficie parcialmente hidrófoba, ya que los ángulos de contacto son altos ( $>50^\circ$ ) para todos los líquidos probados. Estos resultados concuerdan con lo reportado por van Oss (1993), quien menciona que la presencia de la capa pasivada en la superficie del acero inoxidable reduce la posibilidad de que se presenten interacciones polares o electrostáticas que favorezcan la atracción de las moléculas.

En el caso de las placas con depósitos los valores de los ángulos de contacto disminuyeron considerablemente, excepto en el caso del glicerol en contacto con los depósitos tipo A, lo que indica que la presencia de los depósitos en la superficie no modifica de forma importante la afinidad o las interacciones de este líquido con dichas superficies. Cuando el glicerol está en contacto con las superficies se observa que hay un aumento parcial de la hidrofobicidad de las placas con depósitos tipo B en comparación con el acero inoxidable y con el electropulido, ya que, al aumentar las fuerzas de repulsión capaces de interactuar con las moléculas de los líquidos aumenta el ángulo de contacto. Por el contrario, cuando el ángulo de contacto entre el líquido y la superficie disminuye como en el caso de la leche cruda para los dos tipos de depósitos comparados con el acero inoxidable, ya sea pulido o sin pulir, hay un aumento en los grupos capaces de interactuar en la interface líquido-sólido, por lo que aumentan las energías de atracción e interacción por lo cual se da un incremento en la energía libre total. En el ambiente industrial este cambio en el grado de hidrofiliidad aumenta la posibilidad de que las moléculas del medio (en este caso de la leche) sean atraídas y se dé la formación de los depósitos sobre la superficie del acero dentro de los equipos utilizados en la industria láctea (Barish y Goddard 2013).

Las placas con depósitos tipo A presentan valores relativamente menores del ángulo de contacto, en comparación con las placas con depósitos tipo B, esto se debe a que las moléculas que forman mayoritariamente los depósitos tipo A son proteínas las cuales tiene un mayor número de grupos capaces de formar interacciones, en comparación con los minerales. Esta diferencia en el ángulo de

contacto no es significativa esto es considerando el ángulo de contacto para la leche en el acero 304 B para ambos depósitos, pero para el electropulido los depósitos tipo A muestran significativamente menor ángulo de contacto para la leche, que los del tipo B. ya que los minerales que forman los depósitos tipo B tienen una forma más compacta y se encuentran menos dispersos sobre la superficie, por lo que la mayor parte de la superficie de las placas se encuentra cubierta por una capa de residuos de proteínas y otros componentes, parcialmente desnaturalizados o hidrolizados por la temperatura empleada para la formación de estos depósitos (105 °C).

**Cuadro 5:** Ángulo de contacto de diferentes líquidos modelo sobre placas de acero inoxidable 304-2b y electropulido, sin y con depósitos tipo A o B adheridos

<b>Superficie</b>	<b>Agua</b>	<b>Etilenglicol</b>	<b>Glicerol</b>	<b>Leche cruda</b>
<b>Acero 304-2B</b>	52.7±1.1a	59.9±0.6a	66.5±0.6b	48.2±0.9a
<b>Tipo A</b>	24.2±0.9b	40.6±1.2b	66.2±1.8b	23.4±1.7b
<b>Tipo B</b>	23.1±1.2b	46.2±0.3b	74.2±1.6a	26.1±0.9b
<b>Acero electropulido</b>	76.2±0.9a	51.0±0.4a	76.6±0.8a	67.3±0.5a
<b>Tipo A</b>	25.5±1.8c	42.1±1.1b	72.2±0.8b	22.6±1.2c
<b>Tipo B</b>	38.2±1.2b	47.6±0.8b	77.7±0.9a	41.9±1.4b

Diferentes letras en la columna indica diferencia significativa con respecto a la placa sin depósitos de cada tipo de superficie ( $p < 0.05$ ).

Para el acero electropulido se observa que el ángulo de contacto formado por la gota de agua es mayor, en comparación con el ángulo formado por el agua y el acero 304-2B. Este resultado está de acuerdo con lo reportado, ya que el pulido es un tratamiento que busca hacer una superficie hidrófoba y disminuir la interacción de las materias primas y la superficie (Rosmaninho *et al.* 2007). En general este acero sigue la misma tendencia que el acero 304-2B, es decir, el ángulo de contacto es significativamente menor ( $p < 0.05$ ), en las superficies que presentan los depósitos

formados, en comparación con las placas sin depósitos. Dentro de las placas con depósitos las que presentan un menor ángulo de contacto son las placas con depósitos tipo A, siendo significativa la diferencia entre estos ángulos.

En forma de resumen se puede decir, con base a los resultados, que la superficie más hidrofílica es la que presenta la formación de los depósitos tipo A, seguido de los depósitos tipo B y finalmente las placas sin depósitos, esto aplica para ambos aceros.

### **7.2.2. Determinación de la energía libre superficial**

Existen diferentes métodos para determinar la energía libre superficial, cada uno de estos métodos tienen limitaciones y ventajas sobre los demás métodos, por lo que es importante no utilizar un solo método para tener suficiente información y poder realizar comparaciones más confiables. En este caso se utilizó la ecuación de estado, la cual solo toma en cuenta el ángulo de contacto de un líquido de tensión superficial conocida, y no toma en cuenta las interacciones polares o las dispersas. Por otro lado, el método de OWRK utiliza los ángulos de contacto obtenidos con un líquido polar y uno no polar para poder separar la fase dispersa y la fase polar de la energía libre superficial, lo que es importante porque la parte polar ayuda a determinar el grado de hidrofiliidad de la superficie, ya que es el componente que más influye a la mojabilidad (Cappelletti *et al.* 2013).

En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos para la energía libre superficial de las placas sin y con la formación de los depósitos tipo A o B sobre la superficie de las placas de acero 304-2B y electropulido. Los resultados de la ecuación de estado son mayores significativamente ( $p < 0.05$ ) para las placas con depósitos tipo A o B adheridos a la superficie, en comparación con la energía libre de las placas de acero sin depósitos, en ambos casos. Estos resultados eran esperados debido a la presencia de las proteínas y minerales sobre la superficie de las placas, lo que aumenta la hidrofiliidad de la superficie al aumentar los grupos o

especies reactivas que interactúan con las moléculas de los líquidos de referencia (Wickens *et al.* 2014). Estos valores se obtuvieron considerando los ángulos de contacto del agua y de la leche cruda, que son los líquidos de interés para este trabajo.

Al comparar los valores de la ecuación de estado para las placas con depósitos A o B se observa que no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), por lo que se considera que tiene características superficiales similares, en cuanto a la energía libre superficial, esto puede explicarse al señalar que las placas con depósitos tipo B tenían una capa de residuos de proteínas y otros componentes sobre la superficie.

Los resultados determinados por el método de OWRK (Cuadro 6) concuerdan con los determinados por la ecuación de estado, es decir se observa un valor significativamente mayor ( $p < 0.05$ ), para la energía libre de las placas con depósitos tipo A o B, en comparación con las placas que no presentaban la formación de depósitos. Li *et al.* (2015) mencionan que el componente polar de la energía libre tiene una mayor contribución en el incremento de la hidrofiliidad, por lo que si el componente polar de una superficie es mayor indica que el recubrimiento o los depósitos adheridos a la superficie presentan un mayor número de grupos orgánicos con los que es más probable interaccionar. Por otro lado, el componente disperso de la energía libre hace referencia a los grupos capaces de formar enlaces débiles del tipo van der Waals (fuerzas de dispersión, orientación e inducción), por lo que un aumento en esta fracción indica un aumento en los grupos capaces de formar enlaces del tipo dipolo inducido-dipolo inducido, dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido (Andrade *et al.* 2010). Estas fuerzas dispersas son las que tienen mayor influencia en la energía libre superficial de las placas estudiadas, por lo que se considera que las interacciones del tipo van der Waals son las responsables de la interacción entre el líquido y las superficies.

Para las placas analizadas con depósitos hay un aumento significativo ( $p < 0.05$ ), en ambas fases que componen la energía libre en comparación con las placas que no presentan los depósitos de proteínas o minerales. Por este aumento

de grupos se puede considerar que las placas con depósitos adheridos son más hidrofílicas en comparación con las placas sin depósitos. La diferencia entre los valores de energía libre entre las placas de acero inoxidable 304 y las placas electropulidas puede ser a la composición de los mismos depósitos formados en la superficie de las placas, ya que, al variar la composición o la relación de los diferentes componentes varía los grupos funcionales capaces de promover o inhibir la interacción entre las moléculas y la superficie.

**Cuadro 6:** Energía libre superficial de placas de acero 304-2B y electropulido, sin y con depósitos tipo A o B sobre la superficie.

Superficie	Ecuación de estado (J/m <sup>2</sup> )	OWRK total (J/m <sup>2</sup> )	Fracción polar (J/m <sup>2</sup> )	Fracción dispersa (J/m <sup>2</sup> )
<b>Acero 304-2B</b>	49.1±3.6b	55.7±1.6b	1.0±0.1c	54.7±1.5b
<b>Tipo A</b>	62.2±5.9a	122.5±12.5a	4.6±0.6b	117.9±11.9a
<b>Tipo B</b>	61.9±0.3a	125.5±12.9a	12.4±0.4a	113.1±12.a
<b>Acero electropulido</b>	36.7±0.9c	46.4±4.4c	33.7±1.9a	12.7±2.5c
<b>Tipo A</b>	62.1±1.5a	153.2±5.2a	18.8±3.4b	134.4±1.8a
<b>Tipo B</b>	54.7±2.3b	108.9±3.6b	1.9±0.1c	107.0±3.5b

OWRK: Owens-Wendt-Rabel-Kaelble

Diferentes letras en la columna indica diferencia significativa con respecto a la placa sin depósitos de cada tipo superficie (p<0.05)

### 7.2.3. Topografía superficial de las placas de acero

La rugosidad de la superficie es generalmente considerada como una posible causa del aumento de la adhesión de macromoléculas y microorganismos debido al aumento en la superficie disponible además de la protección mecánica ante el proceso de cizallamiento (Wickens *et al.* 2014). Varios estudios han demostrado que existe una correlación positiva entre la adhesión y la rugosidad de la superficie (Jullien *et al.* 2003; Jimenez *et al.* 2013), mientras que otros informan que no existe dicha correlación entre la topografía superficial y la posible adhesión

(Medilanski *et al.* 2002; Hilbert *et al.* 2003). Este conflicto de opinión puede ser debido a diferentes parámetros, como el grado de rugosidad de la superficie estudiada, la composición del líquido, las especies bacterianas ensayadas, los parámetros fisicoquímicos de la superficie, entre otros. Se ha planteado la hipótesis de que las macromoléculas y los microorganismos se adhieren a superficies con una mayor rugosidad, por tres razones: una mayor superficie disponible para la adhesión, la protección de las fuerzas de cizallamiento, y las características superficiales (Hilbert *et al.* 2003, Rosmaninho *et al.* 2007).

La topografía de cualquier superficie tomará la forma de una serie de picos y valles que pueden variar tanto en el perfil, la dispersión y la densidad, que se describen en cierta medida por parámetros tales como Ra (altura media aritmética), Rms (rugosidad media cuadrática), Rt (diferencia entre el pico más alto y el valle más profundo, a través del área de exploración), entre otras. La rugosidad promedio de las placas de acero 304-2B con depósitos tipo A ( $63.1 \pm 0.08$  nm) o B ( $42.2 \pm 0.2$  nm) (Cuadro 7), es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que la rugosidad promedio que presentan las placas de acero 304 sin depósitos ( $30.7 \pm 0.06$   $\mu\text{m}$ ; mientras que para el acero electropulido se observa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de la rugosidad promedio de las placas con depósitos tipo A ( $13.15 \pm 0.15$  nm) así como con depósitos tipo B ( $4.03 \pm 0.13$  nm), en comparación de las placas sin depósitos ( $0.11 \pm 0.01$  nm). Esta diferencia es evidente al observar las Figuras 8 y 9, las cuales muestran imágenes de placas con depósitos tipo A y B, respectivamente. Por otro lado, los depósitos con mayor rugosidad son los depósitos tipo A, ya que están compuestos por una combinación de proteínas que forman una especie de gel con una estructura esponjosa que aumenta la rugosidad.

Entre mayor sea el valor de Rms (Cuadro 7), mayor será la diferencia entre los puntos más altos y los puntos más bajos de los depósitos. Las placas con depósitos tipo A, para ambos tipos de acero, tienen la mayor diferencia entre estos puntos, esto corresponde a la alta rugosidad de la superficie dada por los depósitos. Además de estos valores de rugosidad superficial se analizó el espesor de la capa

de materia orgánica y minerales adheridos a la superficie, las placas con depósitos tipo A presentan un mayor espesor de esta capa, lo que concuerda con los resultados de rugosidad y con la apariencia de estos depósitos.

**Cuadro 7:** Rugosidad superficial y espesor de los depósitos adheridos a las placas de acero inoxidable

<b>Superficie</b>	<b>Ra (nm)</b>	<b>Rms (nm)</b>	<b>Espesor (nm)</b>
<b>Acero 304-2B</b>	30.7±0.06c	41.3±0.01c	NA
<b>Tipo A</b>	63.1±0.08 <sup>a</sup>	84.6±0.02a	100.5±0.01
<b>Tipo B</b>	42.2±0.20b	56.1±0.6b	80.5±0.03
<b>Acero electropulido</b>	0.11±0.01c	0.15±0.02c	NA
<b>Tipo A</b>	13.15±0.15 <sup>a</sup>	16.83±0.13a	14.83±2.17
<b>Tipo B</b>	4.03±0.13b	5.26±0.21b	8.66±1.64

Ra: rugosidad media aritmética

Rms: rugosidad media cuadrática

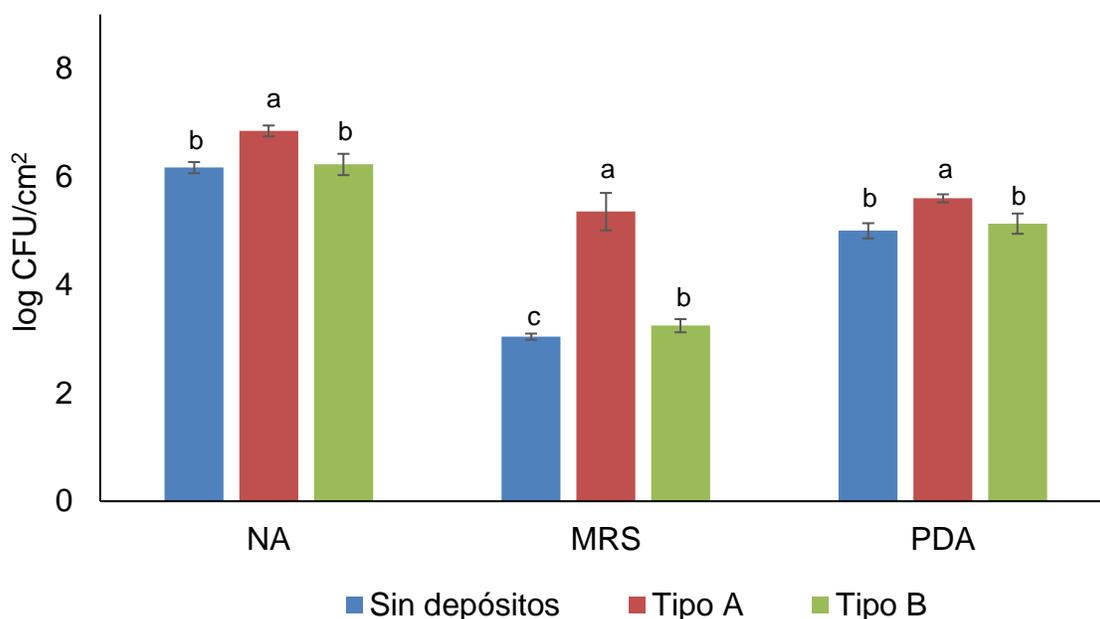
Diferentes letras en la columna indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), con respecto a la placa sin depósitos de cada superficie.

### **7.3. Formación de biopelículas sobre depósitos de leche cruda, formados sobre placas de acero inoxidable**

En la Figura 8 se muestran los resultados de los microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre la superficie de las placas de acero inoxidable sin y con la formación de depósitos tipo A o B. En los tres medios de cultivo (AN, MRS, y PDA), hay una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre placas con depósitos tipo A en comparación con las placas que no presentaban depósitos o que presentaban depósitos tipo B. En la comparación entre los microorganismos recuperados de las placas con depósitos tipo B y las placas sin depósitos no hay una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

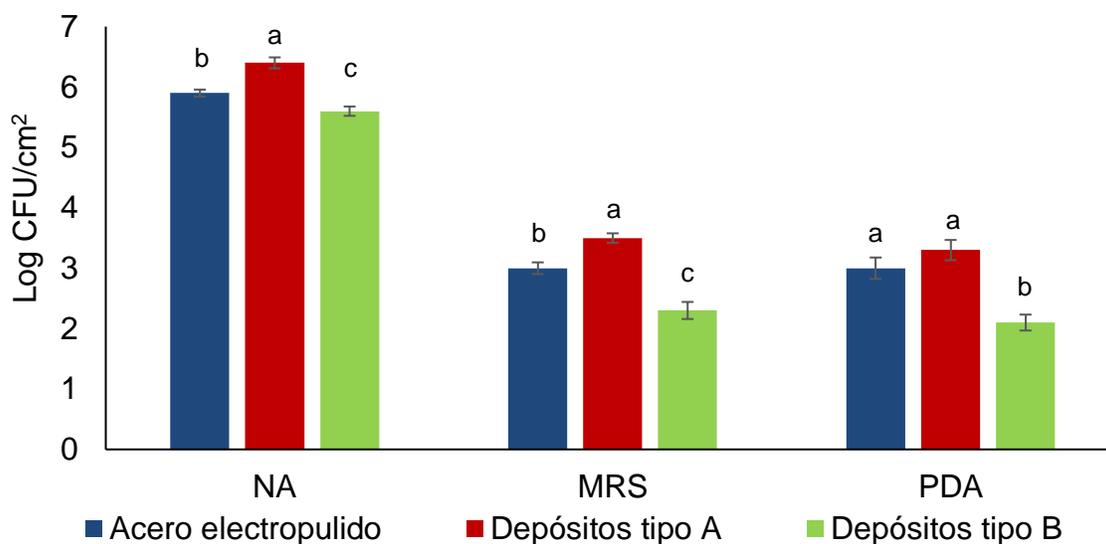
Esta diferencia puede atribuirse al cambio de las características superficiales de las placas de acero, es decir, el aumento en la energía libre superficial y en la rugosidad promedio favorecieron la adhesión de microorganismos

a la superficie ya que aumentan los grupos capaces de formar un enlace del tipo van der Waals o puente de hidrógeno. El aumento en la rugosidad conlleva a la formación de nichos protegidos donde los microorganismos encuentran protección y se favorece la adhesión. Existen estudios donde se reportan modificaciones superficiales que buscan reducir la adhesión de los microorganismos (Barish y Goddard 2013; Boxler *et al.* 2013; Patel *et al.* 2013). Estos estudios han demostrado que al disminuir la energía libre superficial se aumenta la hidrofobicidad de la superficie y se logra una disminución en la adhesión de materia orgánica y de microorganismos. Este estudio mostró una buena concordancia con los estudios antes mencionados, ya que entre mayor fue la energía libre y la rugosidad superficial hubo un mayor aumento en el número de microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre los depósitos adheridos a la superficie.



**Figura 8:** Cuenta total de microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre la superficie del acero inoxidable 304, sin y con depósitos tipo A o B adheridos. Agar nutritivo (NA): Cuenta de microorganismos aerobios. De Man, Rogosa y Sharpe (MRS): Bacterias ácido lácticas. Agar papa-dextrosa (PDA): Levaduras.

En la Figura 9 se muestran los microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre las placas de acero electropulido, en los medios de cultivo utilizados para cada grupo de microorganismos. Tanto para la cuenta total como para las bacterias ácido lácticas se observa la misma tendencia que en el caso de las placas de acero 304, es decir, se recupera un número significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) de células de las placas con depósitos tipo A ( $6.4 \pm 0.1$  y  $3.5 \pm 0.1$  log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente), en comparación con las placas que no presentan los depósitos ( $5.9 \pm 0.1$  y  $3.0 \pm 0.1$  log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente). De las placas con depósitos tipo B, se recupera un número significativamente menor de la población microbiana ( $p < 0.05$ ) ( $5.6 \pm 0.1$  log UFC/cm<sup>2</sup>), en comparación con las placas sin depósitos ( $5.9 \pm 0.1$  log UFC/cm<sup>2</sup>) o con depósitos tipo A ( $6.4 \pm 0.1$  log UFC/cm<sup>2</sup>), como consecuencia de la menor rugosidad de la superficie se removió una parte de las células por lo que las biopelículas no maduraron porque se desprendieron en los lavados diarios.



**Figura 9:** Cuenta total de microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre la superficie del acero electropulido, sin y con depósitos tipo A o B adheridos. Agar nutritivo (NA): Cuenta de microorganismos aerobios. De Man, Rogosa y Sharpe (MRS): Bacterias ácido lácticas. Agar papa-dextrosa (PDA): Levaduras.

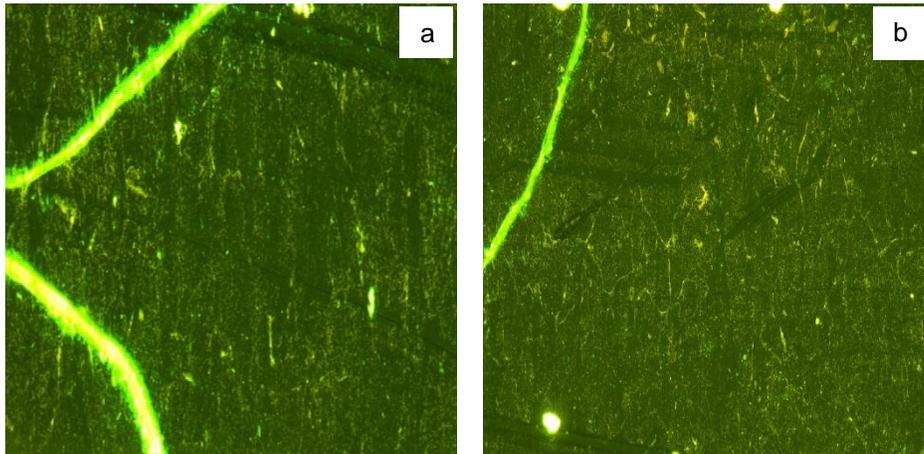
Para las levaduras se observa un resultado contrario a lo esperado, ya que no hay una diferencia significativa entre los microorganismos recuperados de las placas sin depósitos ( $3.0 \pm 0.1 \log \text{ UFC/cm}^2$ ), en comparación con los recuperados de las placas con depósitos tipo A ( $3.3 \pm 0.1 \log \text{ UFC/cm}^2$ ). Al comparar las placas con depósitos A o B se observa que siguen la misma tendencia, ya que la diferencia entre los microorganismos recuperados es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ), es decir que de las placas con depósitos tipo A se recuperan un mayor número de microorganismos que de las placas con depósitos tipo B, esto se observa en las placas de acero tipo 304.

En la comparación de ambos tipos de acero se observa que los microorganismos recuperados de las placas de acero electropulido con depósitos tipo A ( $6.4 \pm 0.1 \text{ UFC/cm}^2$ ) es igual a la concentración de microorganismos recuperados de las placas de acero 304-2B con depósitos tipo B ( $6.2 \pm 0.1 \text{ UFC/cm}^2$ ). Esto concuerda con los resultados obtenidos de la energía libre superficial de estas placas, ya que el valor para las placas electropulidas con depósitos tipo A ( $62.1 \pm 1.5 \text{ J/m}^2$ ) es similar al valor de la energía superficial de las placas de acero 304-2B con depósitos tipo B ( $61.9 \pm 1.5 \text{ J/m}^2$ ). La rugosidad no soporta la similitud en los microorganismos recuperados, ya que la Ra de las placas de acero electropulido con depósitos tipo A es tres veces menor que la presentada por las placas de acero 304-2B con depósitos tipo B.

Por otro lado, el valor más alto en cuanto a la recuperación de microorganismos pertenece a las placas de acero 304-2B con depósitos tipo A ( $6.8 \pm 0.1 \text{ UFC/cm}^2$ ), lo que concuerda con que esta placa es la que presenta menor ángulo de contacto ( $23.4 \pm 1.7^\circ$ ) y, por ende, mayor energía libre superficial ( $62.2 \pm 5.9 \text{ J/m}^2$ ), además de mostrar mayor rugosidad superficial ( $63.1 \pm 0.1 \text{ nm}$ ).

#### 7.4. Viabilidad de las células dentro de la biopelícula

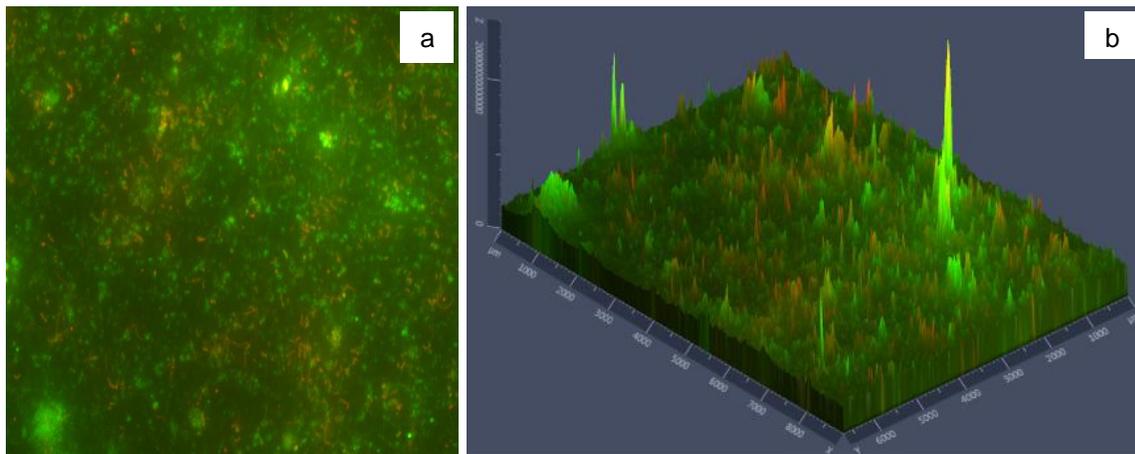
En la Figura 10 se observan las micrografías obtenidas de las placas control, en éstas no se observa fluorescencia que pueda considerarse como interferencia, ya que no se observan formas de microorganismos. Se pueden identificar las líneas características de la superficie del acero, éstas son imperfecciones formadas normalmente en el proceso de fabricación del acero inoxidable, además se pueden identificar ralladuras formadas por acciones mecánicas durante la manipulación del material.



**Figura 10:** Micrografías de placas control, a) placas con bioensuciamiento, sin mezcla de fluoróforos; b) placas sin bioensuciamiento, con mezcla de fluoróforos.

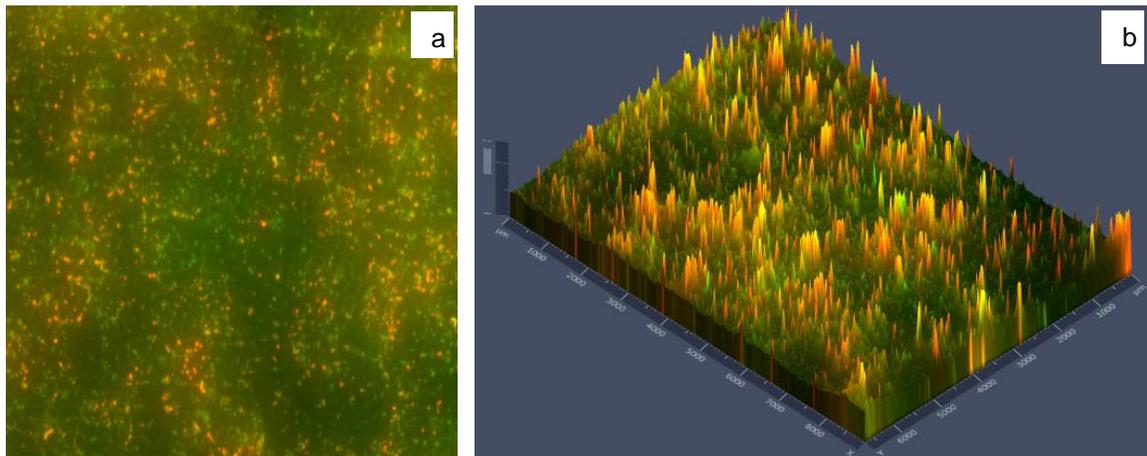
En la Figura 11 se muestran las micrografías de las placas con depósitos tipo A y biopelículas, se observa que hay una mayor fluorescencia verde en comparación con la fluorescencia roja, lo que indica que hay un mayor número de células viables, en comparación con aquéllas que presentan un daño estructural en la membrana. Estas micrografías muestran la complejidad de las biopelículas, ya que se observa una mezcla de células vivas y muertas, embebidas dentro de la matriz de polímeros, lo que representa un peligro de contaminación recurrente de los productos ya que las células pueden mantenerse viables por largos periodos de tiempo (Latorre *et al.*, 2010).

En la Figura 12 se muestran las micrografías obtenidas de las placas con depósitos tipo B y biopelículas, las cuales muestran una mayor fluorescencia roja en comparación con la verde, por lo que se considera que hay un mayor número de células no-viables. Considerando las intensidades de la fluorescencia mostradas en la Figura 3b, puede considerarse que la intensidad de la fluorescencia roja es más intensa que la verde, es decir que los picos son más altos en la gráfica, indicando que se encuentran en planos superiores de la imagen, por tanto, las células no viables se encuentran en las capas superiores de las biopelículas, mientras que las células viables se encuentran hacia el interior de la matriz de sustancias poliméricas extracelulares. Esto podría explicarse considerando que estos polímeros protegen a las células generando microambientes que favorecen el crecimiento de los microorganismos, al disminuir el contacto con el medio ambiente externo y los posibles agentes antimicrobianos. Sería necesario realizar una comprobación de esto mediante un análisis de las imágenes con programas especiales capaces de diferenciar los diferentes planos de las imágenes, otra opción sería realizar la visualización de un corte trasversal de una placa con biopelículas teñidas con esta mezcla de fluoróforos (Wang *et al.*, 2013).



**Figura 11:** Micrografías de placas con depósitos tipo A y biopelículas teñidas con SYTO9 y PI. a) 40x; b) intensidad de la fluorescencia

Al comparar las micrografías de las placas con depósitos B y las micrografías de las biopelículas formadas sobre los depósitos tipo A, se observa que estas últimas presentan una mayor fluorescencia verde en comparación con las placas con depósitos B. Esto puede deberse a que los depósitos de proteínas ofrecen una mayor concentración de nutrientes en comparación con los depósitos de minerales, por lo que podrían soportar el desarrollo de los microorganismos durante un mayor tiempo (Ercolini *et al.*, 2006).

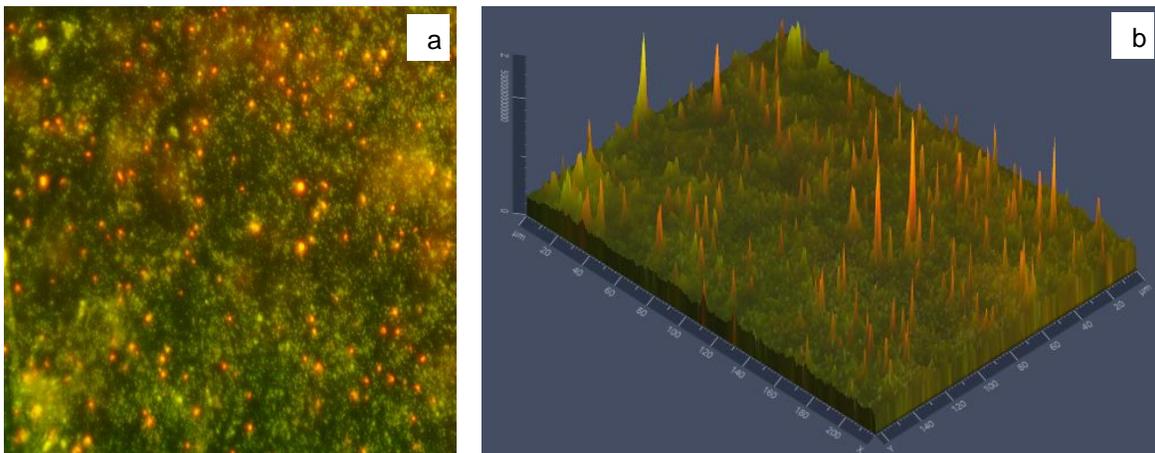


**Figura 12:** Micrografías de placas con depósitos tipo B y biopelículas teñidas con SYTO9 y PI. a) 40x; b) intensidad de la fluorescencia

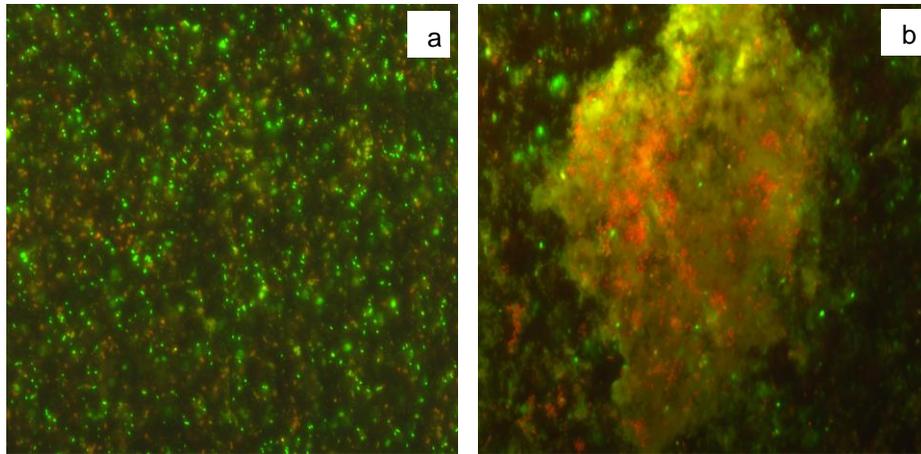
La Figura 13 muestra la tinción con los fluoróforos SYTO9 y PI sobre placas de acero electropulido con depósitos tipo A y biopelículas adheridas a la superficie. Se observa que la fluorescencia verde (células viables) es mayor en comparación con la fluorescencia roja (células no viables), estas células no-viables se encuentran aisladas o en pequeños grupos de células dispersos por la superficie de la placa por lo que podría considerarse que estas células perdieron su viabilidad debido al ambiente que las rodeaba y no por la acción de un agente antimicrobiano.

En la Figura 14a se muestra la tinción de las biopelículas establecidas sobre placas de acero electropulido y la formación de depósitos tipo B, en comparación con la figura anterior se observa que no predomina alguna

fluorescencia sobre la otra, es decir, no se podría decir que hay un mayor número de células viables o que predominan las células no-viables. Lo que es interesante resaltar es la Figura 14b, ya que en esta micrografía se observa un grupo de células no-viables cubiertas por una capa de lo que pudiera ser la matriz de polímeros extracelulares. Podría suponerse que el microambiente dentro del que se encuentran estas células no fuera el adecuado para su desarrollo por lo que perdieron la viabilidad, sin embargo, cercanas a estas células rojas se observa fluorescencia verde, lo que pudiera indicar que estas células son capaces de soportar las condiciones dentro de esta zona, es decir que están mejor adaptadas a las condiciones o que tuvieron la suficiente protección o el suficiente tiempo para preparar la respuesta contra las condiciones del medio ambiente.



**Figura 13:** Micrografías de placas de acero electropulido con depósitos tipo A y biopelículas teñidas con SYTO9 y PI. a) 40x; b) intensidad de la fluorescencia

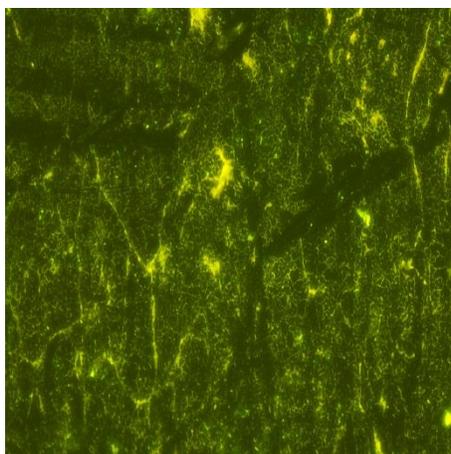


**Figura 14:** Micrografía de placas de acero electropulido con depósitos tipo B y biopelículas teñidas con SYTO9 y PI. a) 40x; b) 63x

### 7.5. Microscopía FISH

Para identificar los diferentes grupos de microorganismos presentes en las biopelículas se prepararon placas de acero 304-2B y placas de acero electropulido, con depósitos tipo A o B, además de la formación de biopelículas, para cada sonda se preparó una placa independiente, además de las placas control.

Estas placas control (Figura 15), pasaron por el mismo tratamiento de hibridación, con la diferencia de que no se utilizó ninguna sonda, sin embargo, se observan señales de fluorescencia, la cual se puede atribuir a la materia orgánica presente tanto en los depósitos como en la biopelícula. No se observa la misma intensidad de la fluorescencia ni formas definidas que pudieran ser tomadas como células, como en las micrografías siguientes. Otra estructura que se aprecia en estas placas son las maclas o grietas superficiales características del acero inoxidable. Estos resultados indican que la materia orgánica del bioensuciamiento no presenta interferencia con la fluorescencia mostrada por la hibridación. Por otro lado, que se hayan observado cristales o agrupaciones del fluoróforo sin una forma definida indica la especificidad de la sonda hacia los microorganismos específicos y no hibridan el material genético que pudiera estar presente en la superficie proveniente de alguna otra fuente.

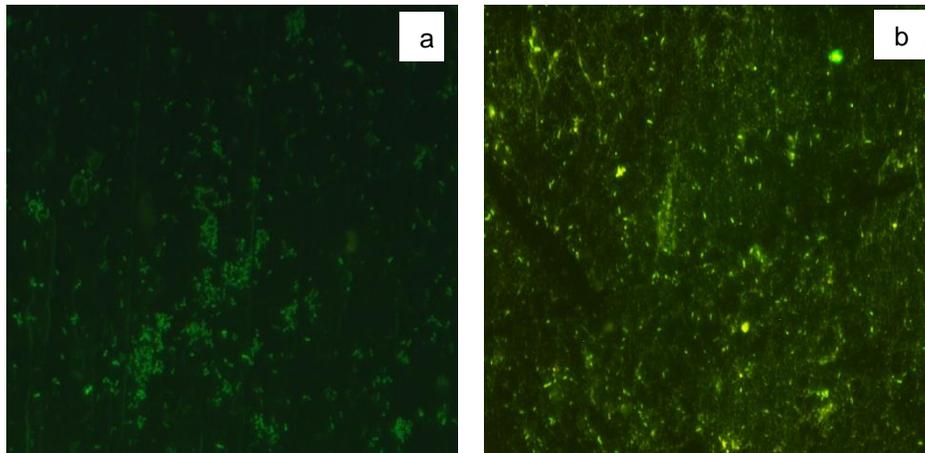


**Figura 15:** Micrográficas de placas control, placas con bioensuciamiento, sin mezcla de fluoróforos.

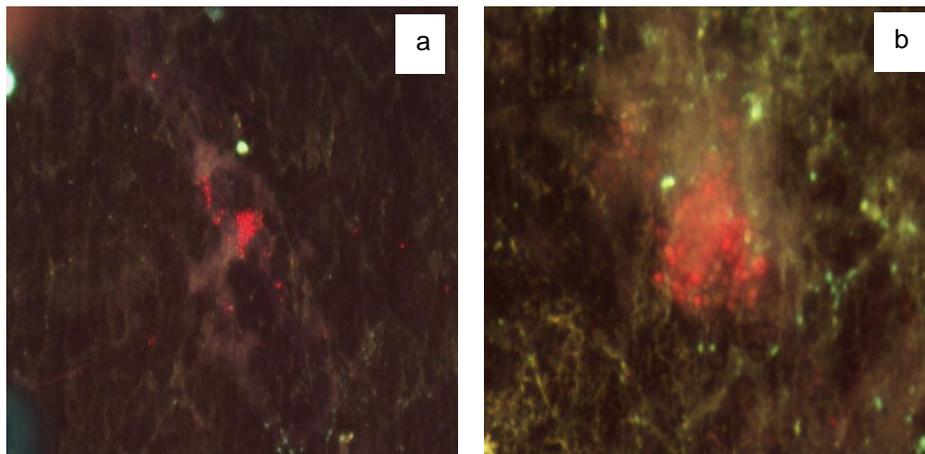
En la Figura 16 se muestran las micrográficas obtenidas de las placas con depósitos tipo A (Fig. 16a) y tipo B (Fig. 16b), además de las biopelículas, en las cuales se utilizó la sonda EUB338 (bacterias). La Figura 16a muestra una gran agrupación de bacterias que se encuentran rodeadas por lo que podría considerarse la matriz extracelular. Cabe resaltar que en las diferentes placas que se prepararon no se observan campos similares, lo que indica que, aunque se siga la misma metodología no siempre se obtendrán biopelículas con la misma apariencia (Santos *et al.* 2014). Lo que si fue posible detectar fue la tendencia de que se observa una mayor fluorescencia de las placas con depósitos tipo A en comparación con las placas con depósitos tipo B (Fig. 16b). En las placas con depósitos tipo B no se observaron grandes acumulaciones de bacterias, las células observadas se encontraban más dispersas por la superficie. En ambos casos se observan morfologías de cocos y bacilos, de más o menos el mismo tamaño, sin que sobresalga algún microorganismo.

En la Figura 17 se observan las micrográficas de las placas con depósitos y biopelícula, con la sonda PF2 (levaduras). En ambos casos (placas con depósitos tipo A o B), se observan células con fluorescencia roja, estas células son de forma alargada y ovoide, forma característica de las levaduras. Como era de esperarse la fluorescencia es menor en estas placas en comparación con las placas anteriores,

ya que estas no fueron inoculadas con alguna suspensión de levaduras, sin embargo, se observan en las micrografías grupos de levaduras más o menos ordenadas y con la zona difusa que rodea las células que ya se ha descrito. El número de células no parece ser muy diferente entre ambas biopelículas, lo cual está de acuerdo con lo observado en el recuento de microorganismos, ya que los conteos obtenidos para ambas placas fueron similares.



**Figura 16:** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda EUB338 (bacterias), sobre placas de acero 304-2B con depósitos, a) tipo A (63x); y b) tipo B (40x)

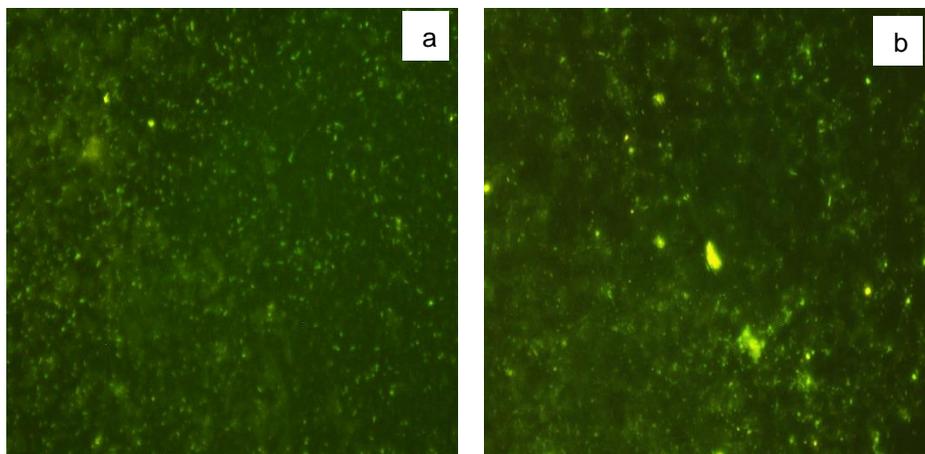


**Figura 17:** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda PF2 (levaduras) sobre placas de acero 304-2B con depósitos y biopelículas a) tipo A (20x); y b) tipo B (40x)

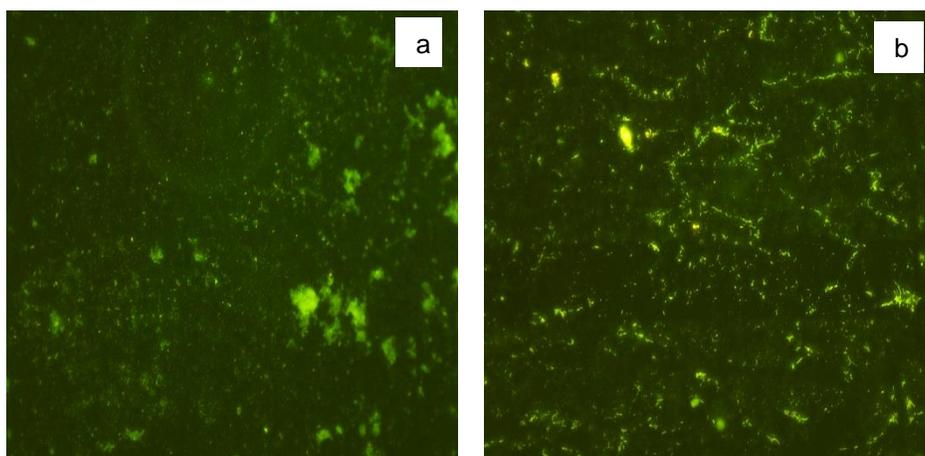
En la Figura 18 se muestran las micrografías obtenidas con la sonda Strc493 (*Streptococcus* spp., y *Lactococcus* spp.), para ambos tipos de depósitos, se observa para ambos casos una fluorescencia intensa y abundante y es fácilmente reconocer la morfología de cocos dentro de la matriz de la biopelícula. No se reconocen bacilos en los campos observados, ni en las micrografías con mayor acercamiento, esto confirma la especificidad de la sonda.

Por otro lado es importante relacionar lo observado en las micrografías con los resultados de la microbiología clásica, esto porque la fluorescencia observada en las placas con depósitos tipo A fue mayor con la observada en las placas con depósitos tipo B, lo que concuerda con lo observado en el recuento de microorganismos, ya que se recuperó un mayor número de bacterias ácido lácticas de las primeras placas ( $5.4 \pm 0.6$  log UFC/cm<sup>2</sup>), en comparación con los microorganismos recuperados de las placas con depósitos tipo B ( $3.2 \pm 0.1$  log UFC/cm<sup>2</sup>).

En este experimento se logró la hibridación de células en forma de bacilos, utilizando la sonda específica para *Listeria* spp. (Lis-637; Figura 19), en ambas placas. La importancia de encontrar este género de microorganismos dentro de las biopelículas formadas por la microbiota de la leche cruda resalta la importancia de realizar un sistema adecuado de limpieza y desinfección dentro de los equipos y utensilios utilizados en la industria alimentaria, para prevenir brotes de enfermedades que pueden representar grandes pérdidas económicas como humanas (Arevalos-Sánchez *et al.* 2012; Campdepadrós *et al.* 2012).



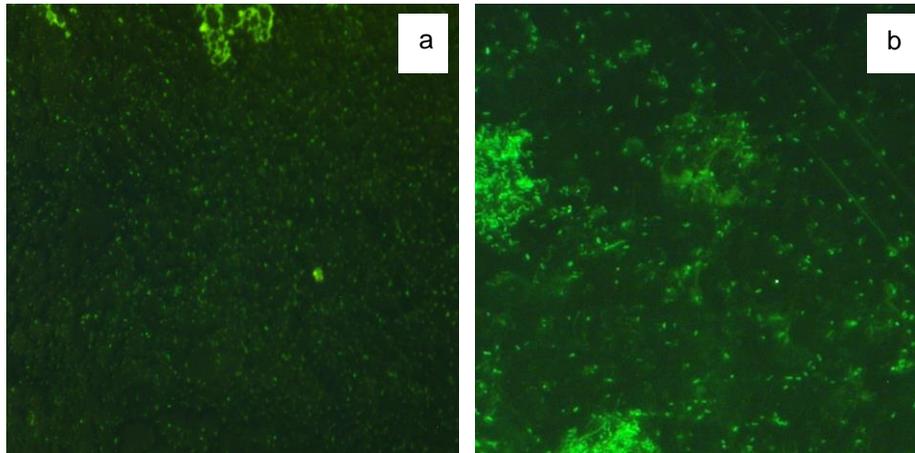
**Figura 18:** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda Strc493 (*Streptococcus* spp., y *Lactococcus* spp.), de placas de acero con depósitos, a) tipo A (40x); y b) tipo B (40x)



**Figura 19:** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda Lis-637 (*Listeria* sp.) de placas de acero con depósitos, a) tipo A (40x); y b) tipo B (40x)

En la Figura 20 se muestran las micrografías obtenidas con el uso de la sonda EUB338 sobre placas de acero electropulido con depósitos tipo A (Fig. 20a) o B (Fig. 20b). Como en el caso de las placas de acero 304-2B se observa que las placas con depósitos tipo A muestran una mayor fluorescencia en comparación con las placas con depósitos tipo B. Estos resultados concuerdan con los observado en la recuperación de microorganismo, ya que se recuperó un mayor número de microorganismo de los depósitos tipo A que de los tipo B. en ambas micrografías se

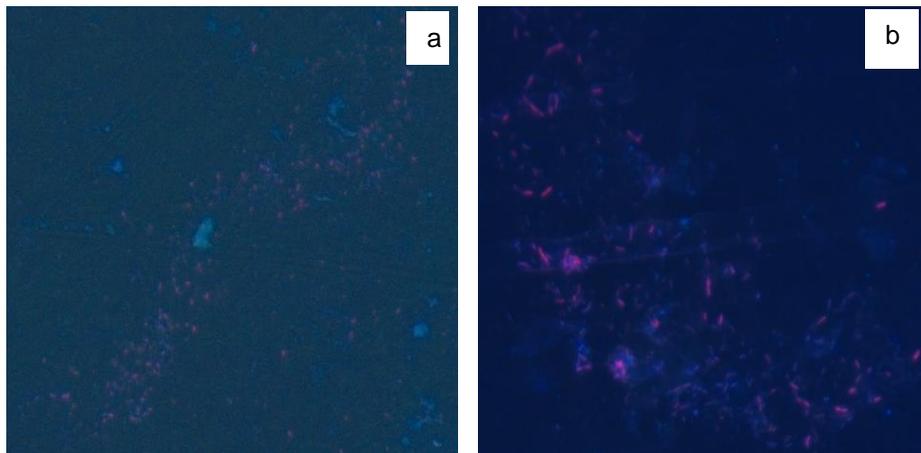
observa una estructura que está cubriendo en parte a las células, esto se ha observado en otras micrografías y puede atribuirse a que parte de la sonda sin reaccionar con su secuencia complementaria queda atrapada en la matriz de polímeros extracelulares por lo que pudiera verse con un aligera fluorescencia.



**Figura 20:** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda EUB338 (Bacterias), de placas de acero electropulido con depósitos, a) tipo A (20x); y b) tipo B (63x)

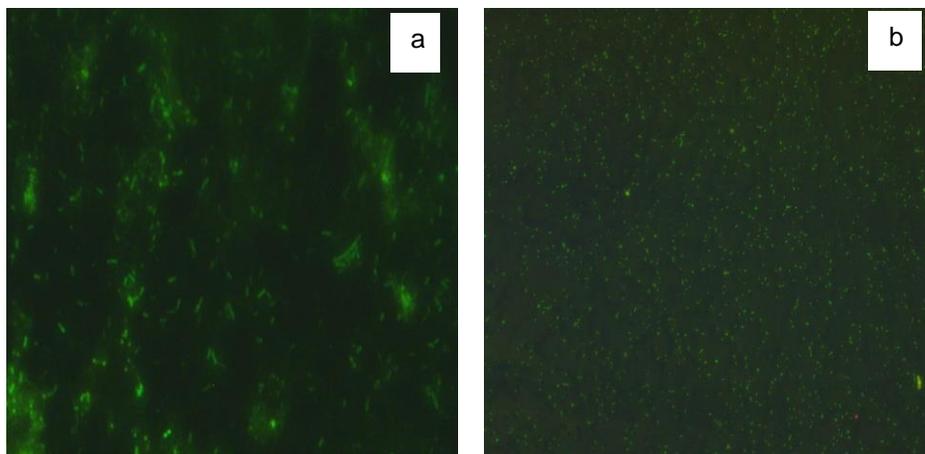
La Figura 21 muestra las micrografías para el mismo tipo de placas, pero utilizando la sonda PF2. Se observa que hay una diferencia clara entre la fluorescencia observada entre las placas con los diferentes tipos de depósitos. Esta diferencia tiene relación con la cantidad de microorganismos recuperados para estos tipos de superficies. Otra diferencia encontrada, en comparación con las imágenes mostradas para las placas de acero 304-2B (Figura 16), tratadas con la misma sonda, es que no se encontraron grupos compactos de levaduras cubiertas por una estructura no definida. Para estas placas se observa que las células están extendidas por la superficie como en el caso de las bacterias. Estas diferencias entre los microorganismos presentes en las biopelículas muestran lo dinámico que es el proceso y resalta la importancia de conocer la dinámica de crecimiento de los microorganismos dentro de estas estructuras para poder diseñar estrategias de prevención y control (Manuzon y Wang *et al.* 2007).

Para las placas en las que se utilizó la sonda Strc493 (Figura 22) se observa que hay una mayor fluorescencia en las placas con depósitos tipo A que en las placas con depósitos tipo B, lo que concuerda con el recuento de microorganismos en el medio MRS, que es selectivo para las bacterias ácido lácticas, para cada tipo de superficie (Figura 9), esto puede deberse a que la cantidad de nutrientes en los depósitos tipo A es mayor en comparación con los depósitos B, ya que tienen una mayor concentración de proteínas, mientras que los B tienen una mayor concentración de minerales. Además de esta diferencia en la composición la diferencia en la rugosidad y la energía libre superficial es otro factor que favorecen la adhesión sobre las placas con depósitos tipo A (Rosmaninho *et al.*, 2008; Li *et al.* 2015).



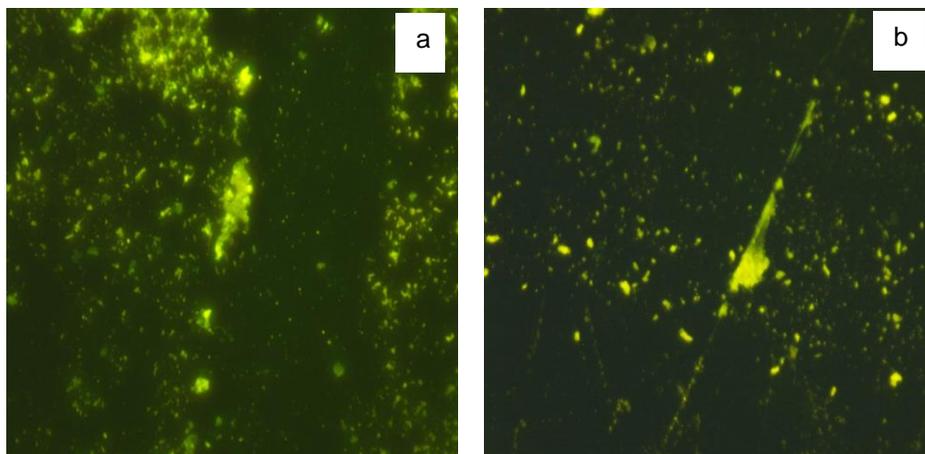
**Figura 21:** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda PF2 (levaduras), de placas de acero electropulido con depósitos, a) tipo A (10x); y b) tipo 338B (40x)

Si se realiza una comparación entre las placas con el mismo tipo de depósitos, pero diferente acero se puede ver que en las placas de acero 304-2B, para ambos tipos de depósitos, hay una mayor fluorescencia que en las placas de acero electropulido, lo cual se debe a la diferencia de rugosidad y energía libre superficial, ya que, estas dos características superficiales son mayores en las placas de acero 304-2B que en las de acero electropulido.



**Figura 22:** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda Strc493 (*Streptococcus* spp., y *Lactococcus* spp.), de placas de acero electropulido con depósitos, a) tipo A (63x); y b) tipo 338B (20x)

En la Figura 23 se muestran las micrografías de la hibridación con la sonda específica para el género *Listeria* (Lis-637), esta sonda se utilizó sobre placas de acero electropulido con depósitos A o B adheridos a la superficie. En ambos casos se logró la identificación de este género de bacterias dentro de las biopelículas formadas por la microbiota de la leche cruda, como en el caso de las placas de acero 304-2B. La identificación positiva de este microorganismo patógeno resalta el peligro de que esta forma de resistencia desarrolle dentro del ambiente industrial, dado que representa un peligro de contaminación recurrente del producto y puede sostener el crecimiento de microorganismos patógenos que disminuyan la inocuidad de los alimentos, poniendo en riesgo tanto de los operarios como de los consumidores finales (Marchand *et al.* 2012; Weiler *et al.* 2013).



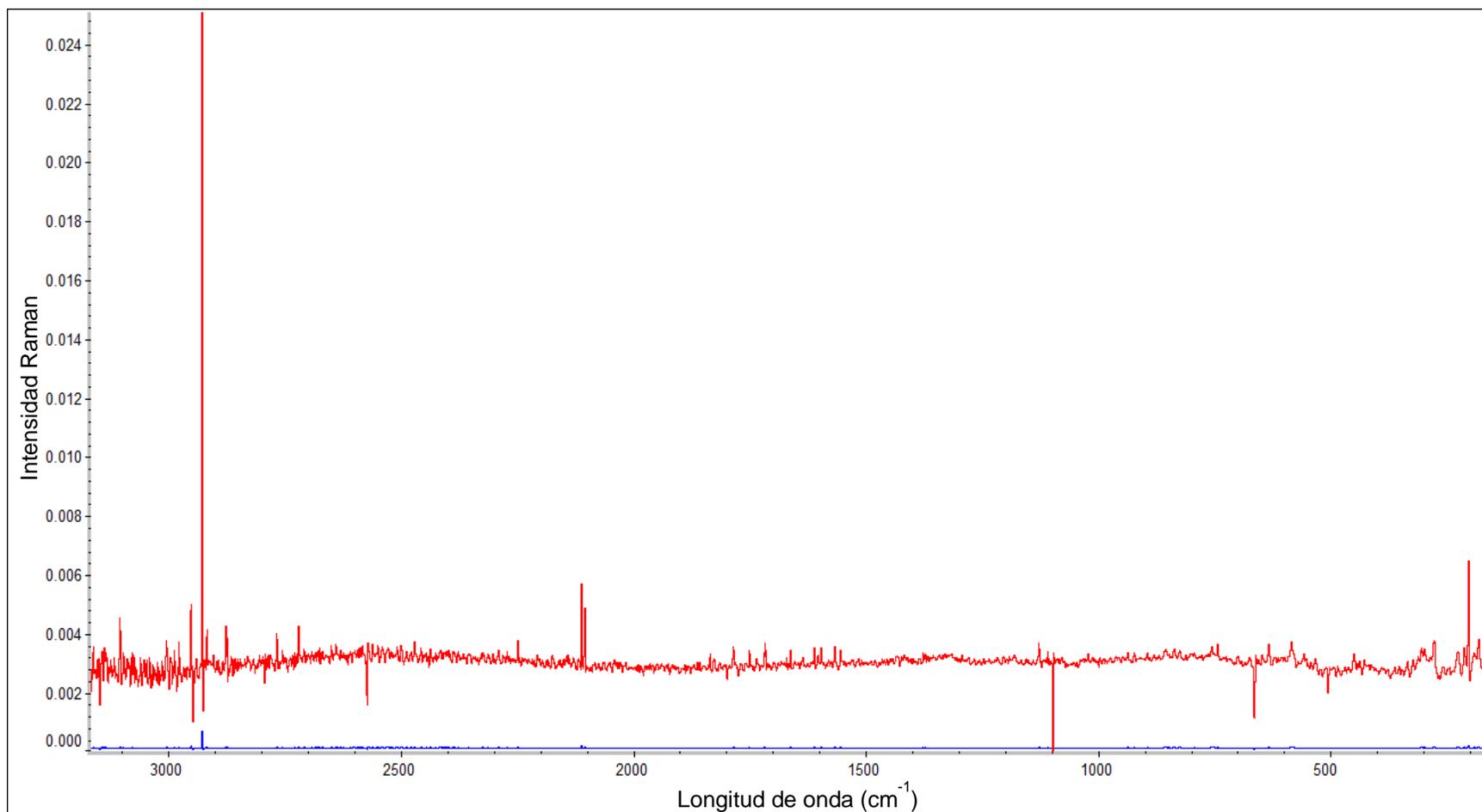
**Figura 23:** Micrografías, obtenidas mediante la técnica FISH, utilizando la sonda Lis-637 (*Listeria* spp.), de placas de acero electropulido con depósitos, a) tipo A (40x); y b) tipo 338B (20x)

## 7.6. Espectroscopía Raman

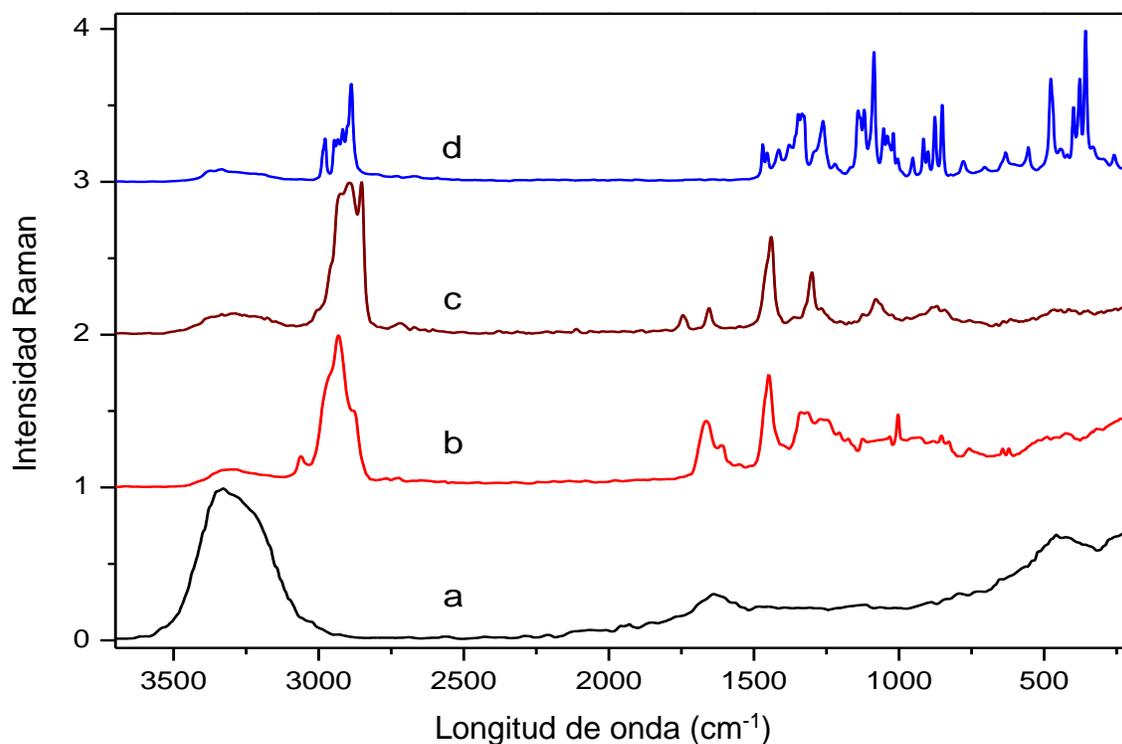
Mediante la espectroscopía Raman se puede identificar qué tipo de interacciones están presentes en la superficie, es decir, se pueden identificar qué tipo de grupos funcionales de compuestos orgánicos y las características de estos que están en la superficie y que pudieran interaccionar con los componentes y los microorganismos presentes en la leche cruda. Estas interacciones pueden ser del tipo van der Waals, polares, puentes de hidrogeno, entre otras que favorezcan la atracción o repulsión de las moléculas o células más próximas (Blanpain-Avet *et al.* 2012).

En la Figura 24 se muestra el espectro del acero 304-2B sin depósitos, en la línea color azul se muestra el espectro en escala normal de intensidad Raman (0-160 cps) y en rojo se muestra un acercamiento (0 – 0.025 cps). Se observa que no hay una señal importante que puede ser considerada como característica a una vibración molecular. Solo se muestra el espectro del acero 304-2B ya que el espectro del acero electropulido es prácticamente el mismo, no se observa una señal que puede diferenciarse del ruido de la lectura.

Para realizar el análisis de los espectros de las superficies con depósitos se utilizó el espectro Raman de los componentes principales de la leche reportado por Mazurek *et al.* (2015) (Figura 25).

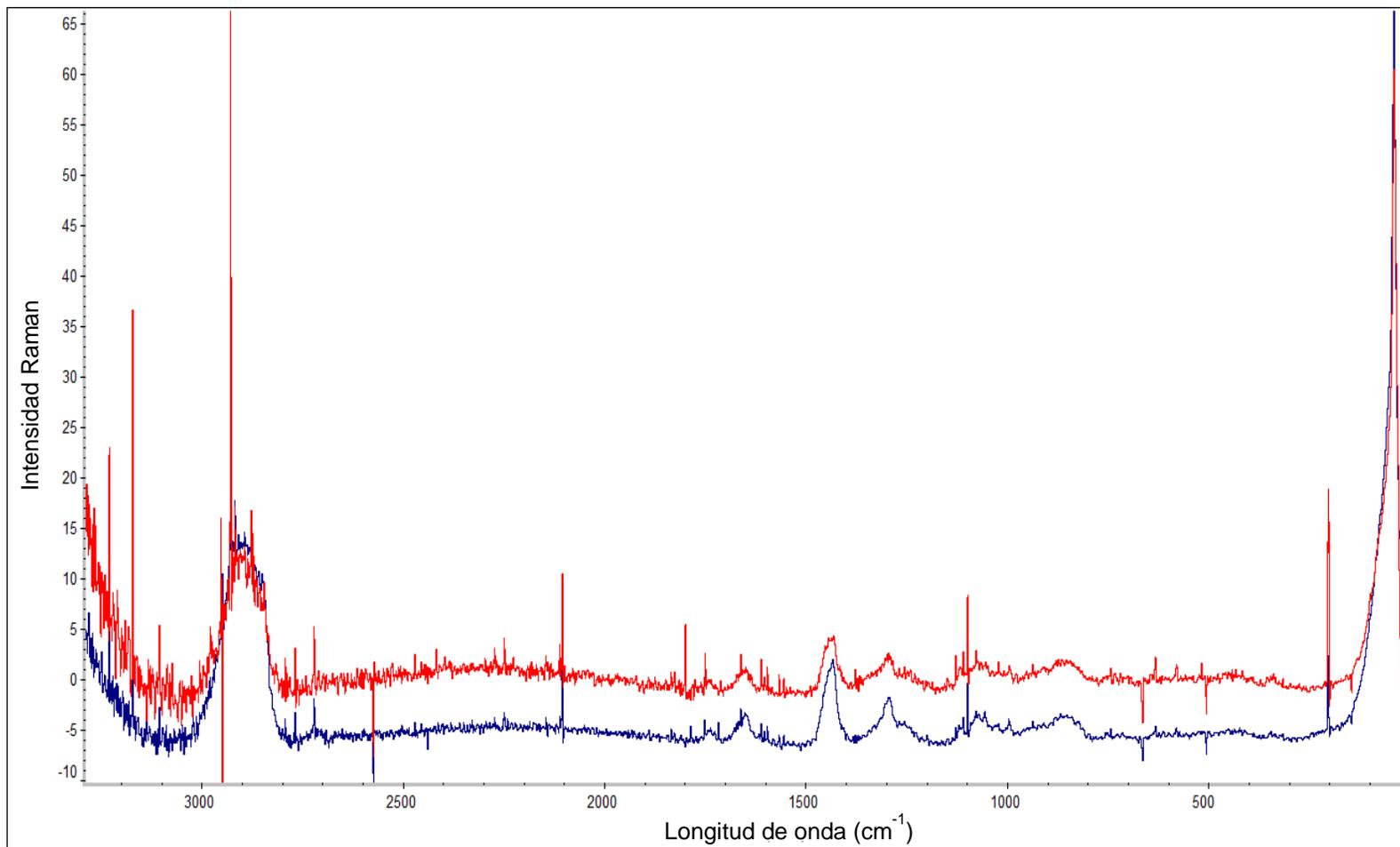


**Figura 24:** Espectro Raman de la superficie del acero 304-2B. Línea azul escala 0-160 cps, Línea roja escala 0-0-025 cps.



**Figura 25:** Espectro Raman de los componentes principales de la leche. a) Agua; b) Caseína; c) Ácidos grasos (mantequilla derretida, ~86% grasa); y d) Lactosa (extraído de Mazurek *et al.* 2015).

La Figura 26 muestra los espectros obtenidos del análisis de las placas de acero 304-2B con depósitos tipo A (línea azul) o tipo B (línea roja). Podemos observar que los espectros en el acero corresponden en algunos picos con los componentes principales mostrados en la Figura 25. Los picos que se encuentran por debajo de los 3000  $\text{cm}^{-1}$  coinciden con los mostrados por las proteínas, ácidos grasos y lactosa, aunque en su forma se asemejan más al pico de los ácidos grasos, en cuanto a lo ancho de la señal y a los dos picos de la parte superior de esta señal. En los 1600  $\text{cm}^{-1}$  se observa un pico ancho que corresponde al mostrado por la caseína. Entre los 1500 y 1200  $\text{cm}^{-1}$  se observan dos picos estrechos, uno de mayor área que el otro, estos corresponden a los mostrados en el espectro de los ácidos grasos dos picos definidos. Las señales que se encuentran entre los 1100 y 1000  $\text{cm}^{-1}$ , varios picos afilados corresponden a los observados en el espectro de la lactosa.



**Figura 26:** Espectro Raman de la superficie del acero 304-2B con depósitos tipo A (línea azul) o tipo B (línea roja).

De Aza *et al.*, (1997) Arifin *et al.* (2014) concuerdan con que señales visibles en los 1000, 560 y 420  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al fosfato de calcio, estas señales están presentes en los espectros correspondientes a los depósitos tipo A y B, siendo más visibles en el espectro de los depósitos tipo B, lo que coincide con los resultados del análisis de la composición de los depósitos que muestran que hay una concentración mayor de minerales en estos depósitos que en los depósitos tipo A.

En el Cuadro 8 se muestran algunos de las señales encontradas en ambos espectros de la Figura 26. Estas señales se pueden asignar a la vibración molecular de algunos grupos funcionales y estructuras más complejas como carbohidratos o aminoácidos, de estos grupos funcionales identificados en los espectros destacan los siguientes: entre los 1620 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  se identifican los aminoácidos tirosina, triptófano y fenilalanina, además de se encuentran señales correspondientes a el grupo funcional amida en los 1650-1640, 1345-1314, 1267-1246  $\text{cm}^{-1}$  provenientes de proteínas, estas señales son ligeramente más intensas en el espectro de los depósitos tipo A (línea azul, Figura 26), que en los depósitos tipo B (línea roja, Figura 26), esto concuerda con los resultados de la composición de los depósitos. Entre los 1464 y 1400  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la vibración de deformación de C-H y  $\text{CH}_2$ , además de la vibración simétrica de  $\text{COO}^-$ , estas señales de la Figura 26 corresponden a las que coincidieron con el espectro de los ácidos grasos de los componentes principales de la leche (Fig. 25c), estas señales son más intensas en los depósitos tipo A en comparación a las mismas para los depósitos tipo B. Entre los 1085 y 1020  $\text{cm}^{-1}$  se identifican señales correspondientes a la vibración por extensión de C-C y C-O de carbohidratos y señales entre los 1020 y 1000  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la deformación del enlace C- $\text{CH}_3$ , este rango de longitud corresponde a las señales que coincidían con las presentes en el espectro de la lactosa (Fig. 25d). el rango entre 3060 y 2800 se encuentra la vibración de extensión del enlace C-H, el cual puede encontrarse en todos los componentes de los

depósitos, nuevamente esta señal es más intensa en el espectro de los depósitos tipo A, en comparación con el espectro de los depósitos tipo B.

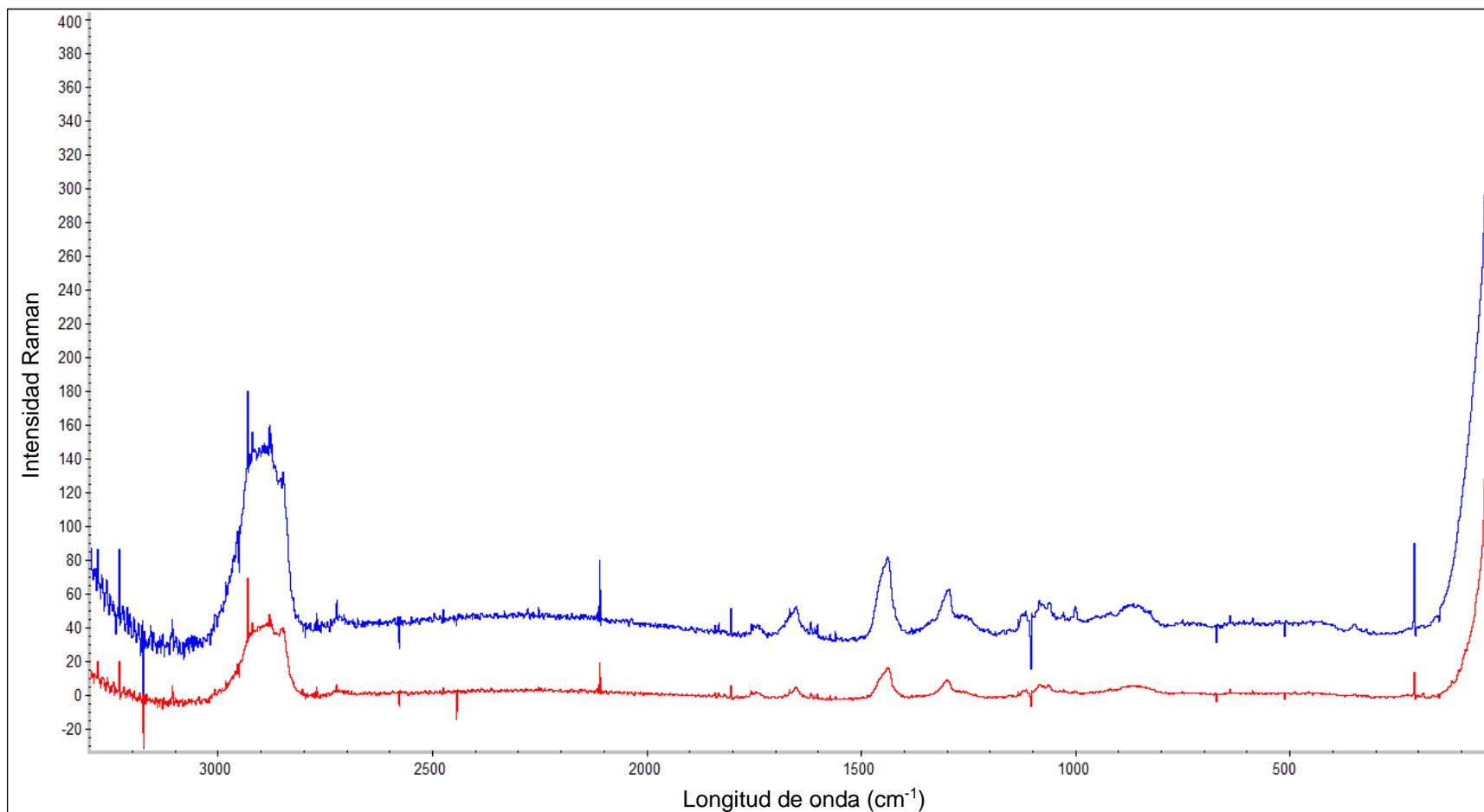
**Cuadro 8:** asignación de grupos funcionales asociados a señales del espectro Raman de placas con depósitos tipo A o B adheridos a la superficie (adaptado de Schwartz *et al.* 2009; Wagner *et al.* 2009; You-Peng *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013)

<b>Frecuencia Raman (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Asignado a:</b>
<b>3060 - 2800</b>	Extensión de C-H
<b>1750 - 1725</b>	Extensión de C=O
<b>1650 - 1640</b>	Asimétrico de COO <sup>-</sup> ; Amida I, C=C
<b>1620 - 1600</b>	C=C; Tyr, Trp, Phe
<b>1590</b>	C=C
<b>1583</b>	Guanidina; Extensión de anillo aromático
<b>1464 - 1400</b>	Deformación de C-H; simétrico de COO <sup>-</sup> ; deformación de CH <sub>2</sub>
<b>1345 - 1314</b>	Amida III proveniente de proteína
<b>1267 - 1246</b>	Amida III
<b>1096</b>	Extensión de C-C; C-O-C del enlace glicosídico; extensión asimétrica de PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<b>1085 - 1020</b>	Extensión de C-C y C-O de carbohidratos
<b>1020 - 1000</b>	Deformación de C-CH <sub>3</sub> ; Phe
<b>899 - 855</b>	Extensión de C-C; enlace glicosídico 1-4
<b>850 - 830</b>	Tyr proveniente de proteína; extensión de C-C
<b>681</b>	Desoxirribosa
<b>420</b>	Calcio

En la Figura 27 se muestran los espectros Raman obtenidos del análisis de las placas de acero electropulido con depósitos tipo A (línea roja) o tipo B (línea

azul). En estos espectros se observan casi los mismos picos que en caso de los espectros del acero 304-2B con depósitos A o B.

Una de las diferencias que se pueden observar es que en estos espectros el ruido es menor, lo que hace que los picos se ven más definidos, lo que podría suceder por la baja concentración de materia orgánica adherida a la superficie del acero electropulido y la menor interferencia (McGoverin *et al.* 2010). Otra diferencia son las señales que se encuentran entre los 1100 y 1000  $\text{cm}^{-1}$  que no están definidos como en el caso anterior, estas señales corresponden a los enlaces C-C, C-O y C-CH<sub>3</sub> de carbohidratos. Para estos espectros se observa nuevamente la señal del calcio ( $200 \text{ cm}^{-1}$ ), la cual es mayor en el espectro de los depósitos tipo B en comparación con el espectro de los depósitos A, esto concuerda con la composición de los depósitos.



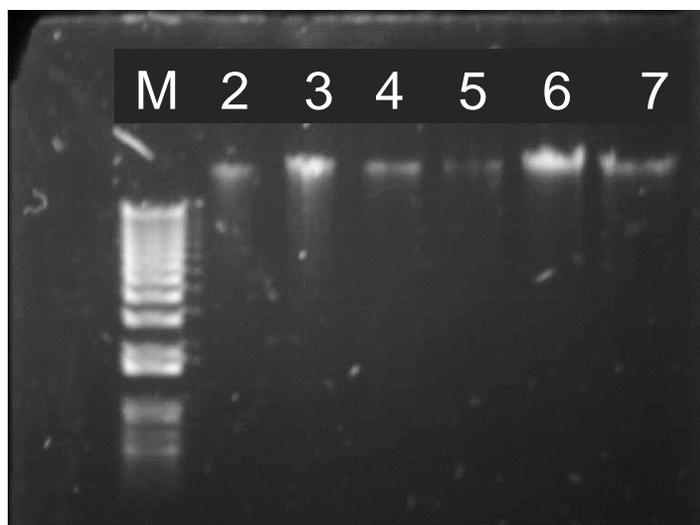
**Figura 27:** Espectro Raman de las placas de acero 304-2B con depósitos tipo A (línea azul) o tipo B (línea roja).

### **7.7. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)**

Para este experimento se extrajo el ADN total de las biopelículas formadas sobre placas de acero inoxidable 304-2B para amplificar el gen 16S de bacterias y 20S de levaduras, para lograr la identificación de la comunidad bacteriana de las biopelículas establecidas por las bacterias de la leche cruda, mediante el uso del DGGE.

En la Figura 28 se muestra el gel de agarosa (1%) con la muestra de ADN total, donde se puede ver que la integridad el ADN total es aceptable, ya que, no se observa un barrido importante en los carriles correspondientes a: “M” marcador “2, 3 y 4” corresponde a los días 1, 3 y 5 de formación de las biopelículas sobre depósitos tipo A y; “5, 6 y 7” a los días 1, 3 y 5 de formación de las biopelículas sobre depósitos tipo B. En el Cuadro 9 se muestran las concentraciones de cada extracción, así como la relación de absorbancias 260/2800 nm, que indica la pureza del ADN en la extracción.

Una vez extraído el ADN total se realizó una PCR para amplificar el gen 16S rRNA de las bacterias, con los primers 9F y 1542R, el volumen final de la mezcla fue de 25  $\mu$ L (Figura 29). Las bandas obtenidas de esta reacción son tenues y no se observa un barrido en los carriles, por lo que se considera que los productos tienen una integridad considerable. Estos productos de la primera reacción se utilizaron para realizar una segunda PCR con los iniciadores 357F-GC y 907R, que comprenden la región V3 del gen 16rRNA de bacterias. Esta zona es una región variable que permite la identificación por género y especie de la comunidad de microorganismos presentes en la comunidad (Figura 30).



**Figura 28:** Gel de agarosa (1%) para las muestras de ADN total de las biopelículas a los días 1, 3 y 5 de maduración, sobre placas de acero inoxidable con depósitos tipo A (carriles 2, 3 y 4) y tipos B (carriles 5, 6 y 7).

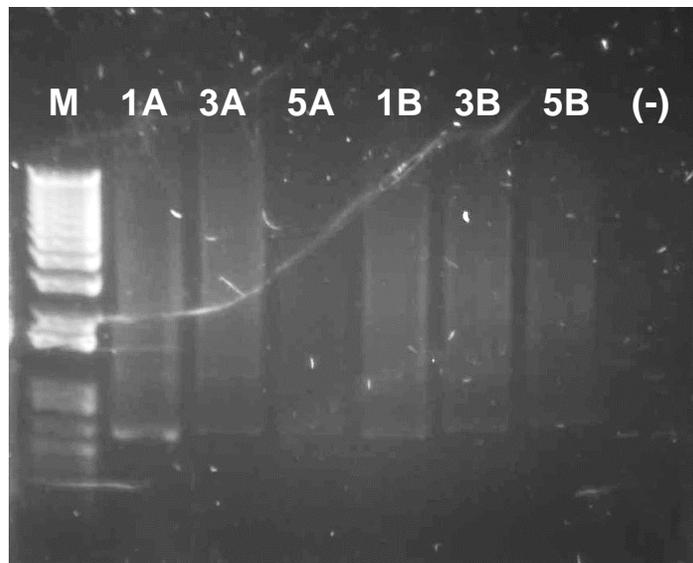
**Cuadro 9:** Concentración de ADN total extraído de las biopelículas formadas sobre placas de acero con depósitos tipo A o B.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ L)	Relación 260/280
1A	22.6	1.72
3A	34.7	1.89
5A	30.0	2.07
1B	38.5	1.88
3B	40.6	1.86
5B	45.4	1.95

1A: día 1, depósitos tipo A. 1B: día 1, depósitos tipo B.



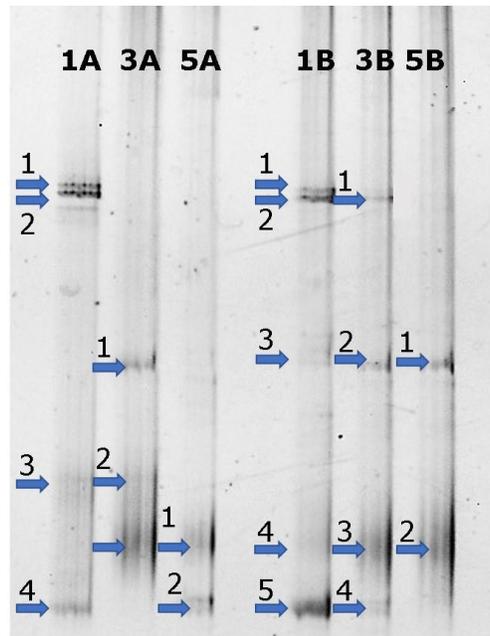
**Figura 29:** Gel de agarosa para los productos de la primera ronda de amplificación de la PCR anidada.



**Figura 30:** Gel de agarosa para los productos de la segunda ronda de amplificación de la PCR anidada.

Se preparó el gel de agarosa para el DGGE con un gradiente de desnaturizante de 30 a 60%, la intensidad de corriente utilizada fue de 80 V, la temperatura fue de 60°C, durante 16 h. en los carriles 1 a 3 se inyectaron las

muestras 1A, 3A y 5A, respectivamente, mientras que en los carriles 5 al 7 se inyectaron las muestras 1B, 3B y 5B, respectivamente (Figura 31). Después del proceso de electroforesis se cortaron las bandas que se identificaron en el gel.



**Figura 31:** Gel completo de DGGE (30-60%) para los productos de PCR para las muestras de ADN genómico total, carriles 1: 1A; 2: 3A; 3: 5A; 4: X; 5: 1B; 6: 3B; y 7: 5B.

En el Cuadro 10 se muestran las bandas y la concentración de ADN extraído de las bandas obtenidas. La baja concentración del ADN eluída de las bandas cortadas no permitió la amplificación con el segundo par de iniciadores, por lo que se realizó el análisis de la imagen obtenida del gel.

En la Figura 32 se muestran las especies encontradas en el gel, son en total 6 especies identificadas que se comparten en los diferentes días de maduración analizados, en las biopelículas formadas sobre los diferentes ensuciamientos (depósitos tipo A o B). En el Cuadro 11 se muestran la intensidad de cada banda, así como su abundancia relativa, determinada con el software Alphaview (V. 3.4.0.729. ProteinSimple. EUA), el índice de diversidad de Shannon-Wiener ( $H'$ ) y de equitabilidad ( $J'$ ), se determinaron mediante las siguientes ecuaciones:

$$H' = - \sum (P_i \ln P_i) \quad (4)$$

Donde:

H' es el índice Shannon-Wiener;  $P_i = \frac{n_i}{N}$ ,  $n_i$  es la intensidad de cada banda en el carril y N es la intensidad total de las bandas del carril correspondiente.

$$J' = \frac{H'}{H'_{max}} \quad (5)$$

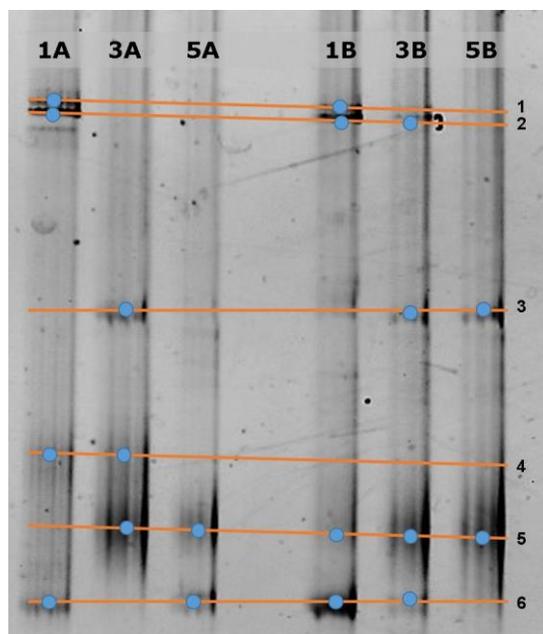
Donde:

J' es el índice de equitabilidad, H' es el índice de Shannon-Wiener y  $H'_{max}$  es el logaritmo natural del total de especies en la muestra (S).

**Cuadro 10:** Concentración de ADN eluido de las bandas cortadas del gel de DGGE de las biopelículas formadas sobre placas de acero con depósitos tipo A o

B.

Banda	Concentración (ng/ $\mu$ L)	Banda	Concentración (ng/ $\mu$ L)
1A1	6.2	1B1	5.2
1A2	5.8	1B2	4.5
1A3	4.2	1B3	4.0
1A4	4.3	1B4	3.6
3A1	3.1	1B5	4.8
3A2	3.7	3B1	3.7
3A3	5.3	3B2	3.9
5A1	5.3	3B3	4.0
5A2	5.9	3B4	5.3
		5B1	3.9
		5B2	5.0



**Figura 32:** Especies identificadas en el gel de DGGE (30-60%) de las biopelículas formadas sobre placas de acero con depósitos tipo A o B.

Con estos datos obtenidos se puede observar que las comunidades de bacterias para las biopelículas formadas en ambos ensuciamientos son similares, ya que entre los índices de diversidad ( $H'$ ) y equitabilidad ( $J'$ ) no hay una variación importante para los mismos días de maduración. Si se comparan estos valores a lo largo de la maduración para el mismo tipo de ensuciamiento, se observa que la diversidad disminuye conforme aumenta el tiempo de maduración. Esto indica que la abundancia de pocas especies va creciendo y dominando sobre las otras especies de bacterias (Quigley *et al.* 2013). Esta tendencia se puede corroborar con el índice  $J'$ , el cual se puede encontrar entre valores de cero (baja equitabilidad), y uno (total equitabilidad). En la muestra, este índice decrece conforme a los días de maduración, lo que indica que ambas comunidades de bacterias están especializándose y están dominadas por pocas especies, que en general son las que tienen una mayor resistencia o se adaptan mejor a las condiciones medioambientales generadas dentro de la matriz de polímeros extracelulares

(Bridier *et al.* 2015; Cisneros-Pérez *et al.* 2017). En la Figura 33 se observa la gráfica de abundancia relativa para las especies encontradas en las biopelículas formadas sobre placas de acero con depósitos tipo A o B. En el día 1, para el ensuciamiento con depósitos tipo A hay 4 especies, siendo la identificada como especie 2 la que presenta mayor abundancia (31%), sin embargo, esta especie deja de ser predominante e incluso ya no se identifica en los días restantes, esto mismo pasa con la especie 1 y 6. En el día 3 de maduración la especie 4 sigue estando dentro de las mayoritarias y las especies 3 y 5 son las que tienen mayor abundancia, cabe destacar que estas especies no fueron detectadas en el día 1, por su baja concentración. En el quinto día de maduración solo son detectadas dos especies, la 5 y 6, nuevamente se encuentra a la especie 5 dentro de las mayoritarias.

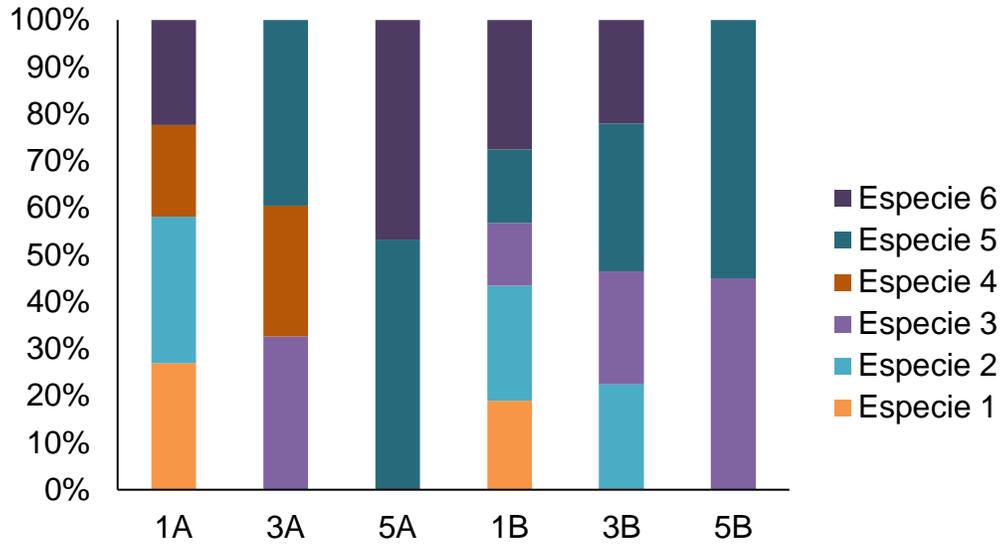
Para las placas con depósitos tipo B se observa un comportamiento similar, es decir, en el día 1 se encuentran 5 especies que van disminuyendo conforme aumenta el tiempo de maduración. Las especies 3 y 5 comienzan siendo las de menor abundancia en el día 1 y al final del proceso de maduración son las especies dominantes dentro de la comunidad de bacterias presentes en la biopelícula formada por la microbiota acompañante de la leche cruda. La especie 1 solo fue detectada en el día 1, mientras que las especies 2 y 6 fueron detectadas hasta el día 3. En el caso de la especie 4 solo fue encontrada dentro de los primeros 3 días de maduración de las biopelículas establecidas sobre placas con depósitos tipo A. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Rochex *et al.* (2008), quienes encontraron que el desarrollo de los microorganismos dentro de la biopelícula, así como su composición, cambian bajo condiciones ambientales diferentes, aunque provengan de un mismo inóculo. En nuestro estudio, aunque se trabajó con el mismo inóculo de leche cruda el número de microorganismos y la diversidad de estos dentro de las biopelículas fue diferentes, debido a las diferentes características superficiales dadas por los diferentes ensuciamientos que favorecieron la adhesión y desarrollo de diferentes especies de bacterias. Estas diferencias en la diversidad se pueden explicar con los diferentes mecanismos de

adaptación de los microorganismos bajo diferentes condiciones de estrés, aunado a las relaciones de simbiosis que se pueden dar dentro de una biopelícula donde se encuentran diferentes especies (Burmølle *et al.* 2014; Røder *et al.* 2016)

**Cuadro 11:** Intensidad de las bandas y abundancia relativa de las especies encontradas en el gel DGGE de las biopelículas formadas sobre acero inoxidable

Especie	1A		3A		5A	
	Intensidad	Abundancia relativa	Intensidad	Abundancia relativa	Intensidad	Abundancia relativa
1	682	0.27	0	0	0	0
2	788	0.31	0	0	0	0
3	0	0	577	0.33	0	0
4	495	0.20	494	0.28	0	0
5	0	0	699	0.39	536	0.53
6	566	0.22	0	0	470	0.47
Índice H'	1.37		1.09		0.69	
Índice J'	0.77		0.61		0.39	
Especie	1B		3B		5B	
1	576	0.19	0	0	0	0
2	744	0.24	466	0.22	0	0
3	406	0.13	502	0.24	560	0.45
4	0	0	0	0	0	0
5	476	0.16	654	0.31	683	0.55
6	838	0.28	458	0.22	0	0
Índice H'	1.57		1.38		0.69	
Índice J'	0.88		0.77		0.38	

Índice H': índice de diversidad de Shannon-Wiener  
Índice J': Índice de equitabilidad.



**Figura 33:** Abundancia relativa de las especies encontradas en el gel de DGGE de bacterias encontradas en las biopelículas, a diferentes tiempos de maduración, sobre ambos tipos de ensuciamiento.

## 8. CONCLUSIÓN

Se realizó el estudio de formación de los tipos de depósitos A o B sobre dos tipos de acero, 304-2B y electropulido. El componente mayoritario para los depósitos tipo A fueron las proteínas, mientras que para los depósitos tipo B fueron los minerales. La presencia de estos depósitos adheridos a la superficie aumentó la rugosidad superficial en 187% para los depósitos tipo A y 137% para el tipo B. La rugosidad del acero electropulido con depósitos el tipo A fue 119 veces superior a la rugosidad inicial de las placas de acero electropulido, mientras que la rugosidad de las placas con depósitos tipo B fue 36 veces mayor en comparación con las placas sin depósitos. A su vez, la estructura de los depósitos concuerda con lo reportado, ya que los depósitos tipo A son esponjosos, suaves y de color blanco, mientras que los depósitos tipo B son compactos y de una mayor dureza.

La presencia de los depósitos disminuyó el ángulo de contacto y por consiguiente aumentó la energía libre superficial, es decir la superficie de las placas con depósitos fue más hidrofílica que sin depósitos. Según la ecuación OWRK, la fracción dispersa es la más importante para determinar la energía libre, es decir que las interacciones que son capaces de atraer o rechazar a la materia orgánica o a los microorganismos presentes en la leche cruda son del tipo van der Waals. La fracción polar no tiene una participación importante en el proceso de interacción. Por otro lado, la espectroscopía Raman permitió identificar algunos de los grupos funcionales presentes, dentro de los cuales podemos destacar a los grupos aromáticos de los aminoácidos tirosina, triptófano y fenilalanina o cadenas de carbono (C-C) que podría ser responsables de la actividad de esta fracción dispersa.

Las características superficiales de los aceros estudiados cambiaron de acuerdo con los depósitos formados y al inocular la leche cruda se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los microorganismos recuperados de las biopelículas formadas sobre las placas de acero inoxidable con depósitos tipo A, en comparación con las placas con depósitos tipo B, y con las placas sin depósitos. El análisis de la comunidad embebida en la matriz polimérica, determinó que se

encuentran tanto células viables (fluorescencia verde) como células no-viables (fluorescencia roja), lo que pone de manifiesto la importancia de realizar un control de esta forma de crecimiento de los microorganismos, ya que, pueden comprometer la inocuidad de los alimentos procesados, al ser una fuente de contaminación recurrente. La viabilidad de las células a lo largo del estudio fue cambiante, aunque se observó que la fluorescencia verde predominó sobre la roja, es decir, que a lo largo del proceso de maduración de la biopelícula había un mayor número de células viables, las cuales formaban aglomeraciones con crecimiento tridimensional. Mediante la técnica FISH, se logró la identificar la distribución de los grupos microbianos detectados mediante técnicas tradicionales de cultivo dentro de la biopelícula formadas en placas de acero 304-2B y acero electropulido sin y con la presencia de depósitos sobre la superficie. Con estos resultados no es posible llegar a una conclusión acerca de la distribución e importancia de estos grupos, ya que las micrografías solo se presentan un momento en el proceso dinámico y extraordinariamente cambiante de maduración de las biopelículas. La identificación de microorganismos del género *Listeria* destaca la importancia del control de las biopelículas para disminuir el riesgo a la salud pública que representan algunos microorganismos de este género como *L. monocytogenes*.

La diversidad de bacterias presentes en la biopelícula formadas por la microbiota acompañante de la leche cruda cambió a lo largo del tiempo de maduración empleado durante los experimentos, muestra de esto es las diferentes especies detectadas en el gel de DGGE. Esto muestra la enorme dinámica que se presenta dentro de la matriz de polímeros extracelulares, al ir cambiando las condiciones de los microambientes, favoreciendo el desarrollo de cierto grupo de microorganismos y deteniendo a otros, provocando que la biopelícula se vaya especializando. Esta característica toma relevancia cuando en el medio se encuentra un microorganismo patógeno dentro de la biopelícula, el cual pudiera no ser detectado por los medios dependientes de cultivo, pero que bajo ciertas

circunstancias se favorezca su desarrollo y se consolide como un riesgo para la salud pública.

El aumento de la energía libre superficial, la rugosidad promedio y la presencia de grupos funcionales aportados por la formación de depósitos tipo A o B sobre las placas de acero inoxidable 304-2B y acero electropulido, favoreció que los microorganismos presentes en la leche cruda se adhirieran en mayor proporción que los microorganismos adheridos a las placas que no presentaban la formación de depósitos en la superficie. Esta mayor adhesión de microorganismos resultó en la formación de biopelículas con una alta diversidad de microorganismos, dentro de la cual se identificaron grupos de microorganismos que representan un peligro de deterioro de los productos procesados en la industria láctea o un peligro para la salud de los consumidores de estos productos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aider M.**, Gnatka E., Benuli M., Pluthakhin G., Kastyuchik A. **2012**. Electro-activated aqueous solutions: Theory and application in the food industry and biotechnology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 15: 38–49.
- Amann R.I.**, Krumholz L., Stah, D.A. **1990**. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
- Andrade Araujo E.**, Andrade Nelio J., Mendes da Silva L. H., Fernandez de Carvalho A., Sá Silva C. A., Mota Rams A. **2010**. Control of microbial adhesion as a strategy for food and bioprocess technology. *Food Bioprocess Technol*, 3:321 – 332.
- AOAC** 923.03 Cap. 32, pág 2. Official Methods of Analysis 18 th Edition, **2005**.
- Arevalos-Sánchez M.**, Regalado C., Martin S. E., Domínguez-Domínguez J., García-Almendárez B. E. **2012**. Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilm, and on listeriolysin O activity. *Food Control*. 24: 116-122.
- Arevalos-Sánchez M.**, Regalado C., Martin S. E., Meas-Vong Y., Cadena-Moreno, E., García-Almendárez B. E. **2013**. Effect of neutral electrolyzed water on *lux*-tagged *L. monocytogenes* EGDe biofilms adhered to stainless steel and visualization with destructive and non-destructive microscopy techniques. *Food Control*. 34: 472-477.
- Arifin M.**, Swedlund P. J., Hemar Y., McKinnon I. R. **2014**. Calcium phosphate in Ca<sup>2+</sup>-fortified milk: phase identification and quantification by Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 12223-12228.
- ASTM**, **2005**. A276-06. Standard specification for stainless Steel bars and shapes. EUA.
- Babos D. V.**, Câmara C. V., Sperança M. A., Pereira-Filho E. R. **2018**. Direct determination of calcium and phosphorus in mineral supplements for cattle by

wavelength dispersive X-ray fluorescence (WD-XRF). *Microchemical Journal*. 137: 272-276.

**Bansal B., Cheng X. C. 2006.** A Critical Review of Milk Fouling in Heat Exchangers. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 5: 27-33.

**Barish J., A., Goddard J., M. 2013.** Anti-fouling surface modified stainless steel for food processing. *Food and bioproducts processing*. 91: 352-361.

**Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H. U., Egli T. 2007.** Assessment and interpretation of bacterial viability by using the Live/Dead BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 3283-3290.

**Blanpain-Avet P., Hédoux A., Guinet Y., Paccou L., Petit J., Six T., Delaplace G. 2012.** Analysis by Raman spectroscopy of the conformational structure of whey proteins constituting fouling deposits during the processing in a heat exchanger. *Journal of Food Engineering*. 110: 86–94.

**Boxler C., Augustin W., Scholl S. 2014.** Composition of milk fouling deposits in a plate heat exchanger under pulsed flow conditions. *Journal of Food Engineering*. 121: 1–8.

**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. 248-254.

**Bridier A., Sanchez-Vizueté P., Guilbaud M., Piard J. C., Naïtali M. 2015.** Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*. 45:167-178.

**Britz T. J., Robinson R. K. 2008.** *Advanced Dairy Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd. UK. 300 pages.

**Burmølle M., Ren D., Bjarnrsholt T., Sørensen S. J. 2014.** Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends in Microbiology*. 22:84-91.

**Campdepadrós M., Stchigel A. M., Romeu M., Quilez J., Solà R. 2012.** Effectiveness of two sanitization procedures for decreasing the microbial

- contamination levels (including *Listeria monocytogenes*) on food contact and non-food contact surfaces in a dessert-processing factory. *Food Control*. 23: 26-31.
- Caixeta D. S., Scarpa T. H., Brugnera D. F. 2010.** Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*., Campinas. 32, 1: 142-150.
- Cappelletti G., Ardizzone S., Meroni D., Soliveri G., Ceotto M., Biaggi C., Benaglia M., Raimondi L. 2013.** Wettability of bare and fluorinated silanes: A combined approach based on surface free energy evaluations and dipole moment calculations. *Journal of Colloid and Interface Science*. 389: 284–291.
- Carrillo-Reyes J., Celis L. B., Alatraste-Mondragón F., Montoya L., Razo-Flores E. 2014.** Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: Community dynamics. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39: 11423-11432.
- Cisneros-Pérez C., Carrillo-Reyes J., Celis L. B., Alatraste-Mondragón F., Etchebehere C., Razo.Flores E. 2015.** Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*. 40:6329-6339.
- Cisneros-Pérez C., Etchebehere C., Celis L. B., Carrillo-Reyes J., Alatraste-Mondragón F., Razo.Flores E. 2017.** Effect of inoculum pretreatment on the microbial community structure and its performance during dark fermentation using anaerobic fluidized-bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42:9589-9599.
- Cocolin L., Aggio D., Manzano M., Cantoni C., Comi G. 2002.** An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast population in raw milk. *International Dairy Journal*. 12: 407-411.
- Codex Alimentarius. 1999.** Reporte de la 4ta reunión del comité del Codex sobre la leche y los productos lácteos. Definición de tratamientos térmicos. Wellington, Nueva Zelanda.

- Cui Y.**, Liu S., Smith K., Yu K., Hu H., Jiang W., Li Y. **2016**. Characterization of corrosion scale formed on stainless steel delivery pipe for reclaimed water treatment. *Water Research*. 88: 816-825.
- Davey K.R.**, Chandrakash S., O'Neill B. K. **2013**. A new risk analysis of Clean-In-Place milk processing. *Food Control*. 29: 248-253.
- De Aza P. N.**, Santos G. C., de Aza S., Cusc R., Arts L. **1997**. Vibrational properties of calcium phosphate compounds. 2. Comparison between hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Chemistry of Materials*. 9: 916-922.
- De Long E.F.**, Wickham G.S., Pace N.R. **1989**. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*. 243: 1360-1363.
- El-Abassy R. M.**, Eravuchira P. J., Donfack P., von der Kammer B., Materny A. **2011**. Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 56: 3-8.
- Ercolini D.**, La Storia A., Villani F., Mauriello G. **2006**. Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *Journal of Applied Microbiology* 100: 765–772.
- Fickak A.**, Al-Raisi A., Dong X. C. **2011**. Effect of whey protein concentration on the fouling and cleaning of a heat transfer surface. *Journal of Food Engineering*. 104: 323–331.
- Franks A. H.**, Harmsen H. J. M., Raangs G. C., Jansen G. J., Schut F., Welling G. W. **1998**. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3336-3345.
- Hai D. N. N.**, Hyun-Gyun Y. **2013**. Changes in resistance of *Salmonella Typhimurium* biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*. 29: 236-240.
- Hall S. L.**, Stoodley P. **2009**. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*. 11, 7: 1034–1043.

- Hayrapetyan H.**, Muller L., Tempelaars M., Abbe T. **2015**. Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. *200*:72-79.
- Hilbert L. R.**, Bagge-Raun D., Kold J., Gram L. **2003**. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *52*: 175- 185.
- Jastrzębska A.**, Brudka B., Szymnnski T., Szlyk E. **2003**. Determination of phosphorus in food samples by X-ray fluorescence spectrometry and standard spectrophotometric method. *Food Chemistry*. *83*:463-467.
- Jiang S.**, Huang X., Zhang C., Cai Z., Zou T. **2015**. Morphological and proteomic analyses of the biofilms generated by *Streptococcus mutans* isolated from caries-active and caries-free adults. *Journal of Dental Sciences*. *10*: 206-215.
- Jimenez M.**, Delaplace G., Nuns N., Bellayer S., Deresmes D., Ronse G., Alogaili G., Collinet-Fressancourt M., Traisnel M. **2013**. Toward the understanding of the interfacial dairy fouling deposition and growth mechanisms at a stainless steel surface: A multiscale approach. *Journal of Colloid and Interface Science*. *404*: 192–200.
- Jolly Y. N.**, Iqbal S., Rahman M. S., Kabir J., Akter S. **2017**. Energy dispersive X-ray fluorescence detection of heavy metals in Bangladesh cows' milk. *Heliyon*. *3*: e00403
- Jullien C.**, Bénézech T., Carpentier B., Leuret V., Faille C. **2002**. Identification of surface characteristic relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, *56*: 77-87.
- Kaelble D. H.** **1970**. Dispersion-polar Surface tension properties of organic solids. *Journal of adhesion*. *2*: 66-81.
- Kempf V. A.**, Trebesius K., Autenrieth I. B. **2000**. Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* *38*: 830-838.

- Kukulka** D. J., Devgun M. **2007**. Fouling surface finish evaluation. *Applied Thermal Engineering*. 27: 1165-1172.
- Kumari** S., Sarkar P. K. **2014**. In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control*. 36: 153-158.
- Latorre** A. A., Van Kessel J. S., Zurakowski M. J., Predhan A. K., Boor K. J., Jayarao B. M., Hourser B. A., Daugherty C. S., Schukken Y. H. **2010**. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci*. 93: 2792-2802.
- Lasa** I., Del Pozo J. L., Penadés J. R., Leiva J. **2005**. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar*. 28: 163-175.
- Li** L., Che L., Liang Q., Mercadé-Prieto R., Wu X., Dong C. X. **2013**. Study on the dissolution of heat-induced ovalbumin gel in alkaline solutions relevant the fouling deposits. *Journal of Food Engineering*. 114: 550-557.
- Li** M., Li N., Xu D., Ren G., Yang K. **2015**. Antibacterial performance of a Cu-bearing stainless steel against microorganisms in tap water. *Journal of Materials Science & Technology*. 31: 243-251.
- Maquelin** K., Kirschner C., Choo-Smith L. P., van den Braak N., Endtz H. P., Naumann D., Puppels G. J. **2002**. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*. 51: 255-271.
- Marchand** S., De Block J., De Jonghe V., Coorevits A., Heyndrickx M., Herman L. **2012**. Biofilms formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety*. 11: 133-147.
- Manuzon** M. Y., Wang H. H. **2007**. Chapter 5: Mixed culture biofilms. En: *Biofilms in the food Environment*. Blaschek H. P., Wang H. H., Agle M. E. (Eds.). Blackwell Publishing and the IFT Press. 105-125.

- Mazurek S.** Szostak R., Czaja T., Zachwieja A. **2015.** Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy. *Talanta*. 138: 285-289
- McGoverin C. M.**, Clark A. S. S., Holroyd S. E., Gordon K. C. **2010.** Raman spectroscopic quantification of milk powder constituents. *Analytical Chimica Acta*. 673: 26-32.
- Medilanski E.**, Kaufmann K., Wick L. Y., Wanner O., Harms H. **2002.** Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion. *Biofouling: the journal of bioadhesion and biofilm research*. 18: 193-203.
- Montañez-Izquierdo V.**, Salas-Vazquez D. I., Rodríguez-Jerez J. J. **2012.** Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control*. 23: 470-477.
- Nada S.**, Djekic I., Tomasevic I., Miocinovic J., Gvozdenovic R. **2012.** Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. *Food Control*. 25: 728-731.
- Owens D. K.** **1969.** Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of applied polymer science*. 13: 1741-1747.
- Patel J. S.**, Bansal B., Jones M. I., Hyland M. **2013.** Fouling behavior of milk and whey protein isolate solution on doped diamond-like carbon modified surfaces. *Journal of Food Engineering*. 116: 413–421.
- Phillips C. A.** **2016.** Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. *International Journal of Food Science and Technology*. 51: 1731-1743.
- Quigley L.**, McCarthy R., O’Sullivan O., Beresford T. P., Fitzgerald G. F. **2013.** The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *Journal of Dairy Science*. 96: 4928-4337.
- Rahman S. M. E.**, Wang J., Deog-Hwan O. **2013.** Synergistic effect of low concentration electrolyzed water and calcium lactate to ensure microbial safety, shelf life and sensory quality of fresh pork. *Food Control*. 30: 176-183.

- Rochex A.**, Jean-Jaques G., Bermet N., Escudié R. **2008**. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water Reserch.* 42:4915-4922.
- Røder H, L.**, Sørensen S, J., Burmølle M. **2016**. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? *Trends in Microbiology.* 24:503-513.
- Rohde A.**, Hammerl J. A., Appel B., Dieckmann R., Dahouk S. A. **2015**. FISHing for bacteria in food - A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria? *Food Microbiology.* 46: 395-407.
- Rosmaninho R.**, Rizzo G., Müller-Steinhagen H., Melo L. F. **2008**. Deposition from a milk mineral solution on novel heat transfer surfaces under turbulent flow conditions. *Journal of Food Engineering.* 85: 29–41.
- Rosmaninho R.**, Santos O., Nylander T., Paulsson M., Beuf M., Benezech T., Yiantsios S., Andritsos N., Karabelas A., Melo L. F. **2007**. Modified stainless steel surface targeted to reduce fouling—evaluation of fouling by milk components. *Journal of Food Engineering.* 80: 1176–1187.
- Sadeghinezhad E.**, Newaz S. K., Badarudin A., Nashrul M. M. Z., Lotfizadeh B. D., Sean C. O. **2013**. A review of milk fouling on heat exchanger surfaces. *Rev. Chem. Eng.* 29, 3: 169–188.
- Schmid M.**, Walcher M., Bubert A., Wagner M., Wagner M., Schleifer K.H. **2003**. Nucleic acidbased, cultivationindependent detection of *Listeria* spp. and genotypes of *L. monocytogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 215-225.
- Schwartz T.**, Jungfer C., Heißler S., Friedrich F., Faubel W., Obst U. **2009**. Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectrometry, and ESEM imaging to study natural biofilms grown on filter materials at waterworks. *Chemosphere.* 77: 249-257.
- Santos R. S.**, Guimarães N., Madureira P., Azevedo N. F. **2014**. Optimization of a peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA-FISH) method for the detection of bacteria and disclosure of a formamide effect. *Journal of Biotechnology* 187: 16–24.

- Sigua G.**, Adhikari S., Frankel G. S., Pascall M. A. **2010**. The use of atomic force microscopy to measure the efficacies of various chemical sanitizers in removing organic matter from glass surfaces. *Journal of Food Engineering* 100: 139-144.
- Simões M.**, Simões L. C., Vieira M. J. **2010**. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*. 43: 573–583.
- Sovenihazy K. M.**, Bordelon J. A., Petty. T. **2003**. Spectroscopic studies of the multiple binding modes of a trimethine-bridged cyanine dye with DNA. *Nucleic Acids Research*. 31: 2561-2569.
- Srey S.**, Jahid I. K., Ha S. D. **2013**. Biofilm in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 31: 572-585.
- Stankey J. A.**, Akbulut C., Romero J. E., Govindasamy-Lucey S. **2015**. Evaluation of X-ray fluorescence spectroscopy as a method for the rapid and direct determination of sodium in cheese. *J. Dairy Sci.* 98: 5040-5051.
- Steiner P. D.**, Mandrino D. **2016**. AES and XPS investigations of the cleaning-agent-induced pitting corrosion of stainless steels used in the food-processing environment. *Food and Bioprocess Processing*. 100:230-237.
- Stiefel P.**, Schmidt-Emrich S., Maniura-Weber K., Ren Q. **2015**. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*. 15: 36
- Stiles P. L.**, Dieringer J. A., Shah N. C., Van Duyne R. P. **2008**. Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 1: 601-626.
- Tamine A. Y.** (Editor). **2009**. *Milk Processing and Quality Management*. Blackwell Publishing Ltd. Ayr, UK. 324 pag.
- Thermo Fisher Scientific.** **2010**. Chapter 8: Nucleic acid detection and Analysis. *Molecular Probes Handbook*. 11<sup>th</sup> Edition. 302-360.
- Trevors J. T.** **2011**. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilms cells. *Journal of Microbiological Methods*. 86: 266-273.
- Van Oss C. J.** **1993**. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 78: 1-49.

- Van Oss C. J. 1995.** Hydrophobicity of biosurfaces: origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 5: 91-110.
- Wagner M., Ivleva N. P., Haisch C., Niessner R., Horn H. 2009.** Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS-Matrix. *Water Research*. 43: 63-76.
- Wang H., Ding S., Wang G., Xu X., Zhou G. 2013.** In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 167: 293-302.
- Weiler C., Iffland A., Naumann A., Kleta S., Noll M. 2013.** Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *International Journal of Microbiology*. 161: 61-68.
- Wickens D., Lynch S., West G., Kelly P., Verran J., Whitehead K. A. 2014.** Quantifying the pattern of microbial cell dispersion, density and clustering on surfaces of differing chemistries and topographies using multifractal analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 104: 101–108.
- Wimpenny J., Manz W., Szewzyk U. 2000.** Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev*. 24:661–671.
- Young-Min B., Seung-Youb B., Sun-Young L. 2012.** Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. 153: 465-473.
- You-Peng C., Peng Z., Jin-Song G., Fang F., Xu G., Chun L. 2013.** Functional groups characteristics of EPS in biofilms growing on different carriers. *Chemosphere*. 92: 633-638.
- Zhao Q., Liu Y., Wang C., Wang S., Müller Steinhagen H. 2005.** Development and evaluation of Ni-Cu-P-PTFE composite coating to minimize microbial adhesion. In 6<sup>th</sup> International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning-

Challenges and Opportunities. (Edits) Engineering Conferences International, Kloster Irsee, Germany. Vol. RP2, 17: 103-108.