

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO SOBRE LA FORMACIÓN Y CONTROL DE  
BIOPELÍCULAS DE *Listeria monocytogenes* EN  
SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE Y VIDRIO”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**DALIA VÁZQUEZ CELESTINO**

DIRIGIDA POR

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO SOBRE LA FORMACIÓN Y CONTROL DE  
BIOPELÍCULAS DE *Listeria monocytogenes* EN  
SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE Y VIDRIO”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**DALIA VÁZQUEZ CELESTINO**

DIRIGIDA POR

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**

**SINODALES**

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

**Dra. BLANCA GARCÍA ALMENDAREZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dra. SILVIA AMAYA LLANO**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Q. en A. RAFAEL PÉREZ MUÑOZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

"Desgraciadamente para las mentes científicas Dios no puede ser descubierto o demostrable a través de métodos puramente científicos. Pero esto no demuestra nada, tan solo que se están usando los instrumentos equivocados para esta tarea."

J.B. Phillips

Esta tesis la dedico a mis padres, por todo el apoyo, cariño y comprensión que me brindaron. Sin ustedes no habría podido llegado hasta el final de mi carrera.

**Los amo con todo mi corazón.**

# Agradecimientos

Primera<sup>mente</sup> agradezco a Dios por permitirme culminar una de mis metas y por llenar mi vida de dichas y bendiciones.

A ti Mamá, por todo el amor que siempre me has dado, porque siempre tuviste palabras de aliento cuando más lo necesite, por enseñarme a luchar por lo que quiero y nunca darme por vencida.

A ti papá, por todos esos momentos en los que me brindaste tu atención, por siempre estar pendiente de lo que necesitara y por todo el amor que tienes por tu hijas, que aunque no lo dices muy seguido, lo demuestras y por darme la oportunidad y la confianza de estudiar fuera de casa.

A mis hermanas, por ser un ejemplo para mí, por la compañía y el apoyo que me han brindado. A Defe, por darme ánimos y consejos para seguir adelante cada día. A Cynthia, porque me has enseñado que todo se puede lograr con esfuerzo y perseverancia. Las quiero mucho niñas!!!

A mi sobrinito Fer, por alegrarme cada día con esa sonrisa tan linda y por siempre tener esa chispa que hace de momentos difíciles, momentos memorables. A Lalo, por su tiempo y paciencia para ayudarme en esos esas situaciones en que requeri de su ayuda y por darme ánimos para seguir adelante.

A mi abuelita, por todo el cariño que siempre me has brindado y por esa forma tan sana de curarnos para no enfermarnos de nuevo.

A mis tíos y primos, por los momentos que compartimos y porque a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar.

A David, por todo el cariño que me has demostrado, por siempre estar ahí cuando más lo necesite, por todo el apoyo que incondicionalmente me brindas y por todos los momentos felices. TQM!!!!

A mis amigos y amigas, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y escucharme. Por su confianza, lealtad y amistad. Por todos esos buenos momentos que compartimos y darme muchos días felices y llenos de risas.

Agradezco a mis maestros por el conocimiento adquirido durante toda la carrera. Al Dr. Carlos Regalado y la Dra. Blanca, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis bajo su dirección y a mis sinodales, la Dra. Silvia y maestro Rafa por su paciencia y dedicación para llevar a cabo este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Martha, Yan, Norma, Violeta, Fer, Poncho, Luis, Aldo por hacer cada día de trabajo más divertido con sus ocurrencias y formas de ver la vida. Por sus ánimos, consejos y ayuda brindada para la realización de mi trabajo.

Agradezco a CONACYT por el apoyo brindado al proyecto QRO-2008-C02-101687 "Estudio de la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* en ambientes de procesamiento de alimentos y su biocontrol".

Por último, quiero agradecer a esta Universidad por permitirme crecer en todos los aspectos de mi persona, por darme la oportunidad de conocer a todas esas personas importantes en mi vida y finalmente porque aquí he vivido la mejor etapa de mi vida.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Biopelículas formadas por bacterias	3
II.1.1 Definición	3
II.1.2 Características	3
II.1.3 Etapas de formación	5
II.1.3.1 Adhesión	5
II.1.3.1 Adhesión	5
II.1.3.1.1 Adhesión reversible	6
II.1.3.1.2 Adhesión irreversible	6
II.1.3.1.3 Topografía de las superficies	7
II.1.3.1.4 Preacondicionamiento del sustrato	8
II.1.3.2 Formación de microcolonias y secreción de SPE	8
II.1.3.3 Maduración de la biopelícula	9
II.1.4 Modelos estructurales de biopelículas	9
II.1.4.1 Teoría del modelo monocapa	10
II.1.4.2 Teoría del modelo multicapa – 3D	10
II.1.4.3 Concepto actual de biopelícula	11

II.2 Resistencia de las células en biopelícula a la limpieza y agentes sanitizantes	11
II.3 <i>Lactococcus lactis</i>	12
II.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
II.4.1 Listeriosis	14
II.5 Importancia de las biopelículas en la industria de alimentos	14
II.6 Antimicrobianos usados contra biopelículas de <i>L. monocytogenes</i>	15
II.7 Agua electrolizada	16
II.7.1 Características	16
II.7.2 Producción	17
II.7.3 Mecanismo de acción	17
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
IV. 1 General	20
IV. 2 Específicos	20
V. METODOLOGÍA	21
V.1 Materiales	21
V.1.1 Biológicos	21
V.1.2 Antimicrobiano	21
V.2 Métodos	21
V.2.1 Microorganismo y condiciones de crecimiento	21
V.2.1.1 Activación y preparación del inóculo de <i>L. lactis</i> UQ2	21
V.2.1.2 Activación y preparación del inóculo de <i>L. monocytogenes</i> Scott A	22
V.2.2 Preparación de las superficies	22



V.2.2.1 Superficies de vidrio	22
V.2.2.2 Superficies de acero inoxidable	22
V.2.3 Preacondicionamiento de las superficies	22
V.2.4 Desarrollo de las biopelículas	23
V.2.4.1 Crecimiento de biopelículas de <i>L. lactis</i> UQ2	23
V.2.4.2 Crecimiento de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A	23
V.2.5 Cinética de crecimiento de las biopelículas	23
V.2.6 Tinción con cristal violeta y observación en el microscopio	23
V.2.7 Microscopía de hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	24
V.2.8 Tratamiento de biopelículas con agua electrolizada neutra	24
V.2.9 Recuperación de células formadoras de la biopelícula	25
V.2.10 Tratamiento de células libres con agua electrolizada neutra	25
V.2.11 Recuperación de células libres viables	25
V.2.12 Análisis de datos	26
VI. RESULTADOS	27
VI.1 Cinética de crecimiento de biopelículas de <i>L. lactis</i> UQ2 y <i>L. monocytogenes</i> Scott A	27
VI.2. Tratamiento de células libres con agua electrolizada neutra	29
VI.3 Tratamiento de biopelículas con agua electrolizada neutra	36
VI.4 Tinción con cristal violeta	40
VI.5 Microscopía de hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	41
VII DISCUSIÓN	45
VIII CONCLUSIONES	54
IX. BIBLIOGRAFÍA	56



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características de las biopelículas.	4

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso de formación de la biopelícula. (1) Adhesión; (2) formación de microcolonias; (3) secreción de SPE; (4) maduración; (5) dispersión de células.	6
2	Micrografías epifluorescentes de biopelículas producidas sobre acero inoxidable por 4 cepas de <i>L. monocytogenes</i> . (a) Crecimiento de la biopelícula; (b) canales dentro de la biopelícula; (c) crecimiento en las estrías del acero inoxidable (d) multicapas de microcolonias. La referencia no menciona dimensiones.	10
3	Diagrama de formación de la biopelícula de acuerdo al modelo estructural actual o champiñón.	12
4	Diagrama de producción del agua electrolizada.	18
5	Cinética de crecimiento de biopelículas de <i>L. lactis</i> UQ2 sobre vidrio y acero inoxidable.	28
6	Cinética de crecimiento de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A sobre vidrio y acero inoxidable.	28
7	Inactivación de células libres de <i>L. lactis</i> UQ2 por la exposición a 100 y 500 ppm de AEN por 0.5, 1.5, 2, 4, 6 y 15 min.	29
8	Inactivación de células libres de <i>L. lactis</i> UQ2 por la exposición a 5, 15, 30 y 50 ppm de AEN por 0.5 y 1.5 min.	30
9	Inactivación de células libres de <i>L. monocytogenes</i> Scott A por la exposición a 30, 50 y 500 ppm de AEN por 1, 5 y 10 min.	31
10	Inactivación de células libres de <i>L. monocytogenes</i> Scott A por la exposición a 5, 10 y 20 ppm de AEN por 1, 4 y 8 min.	31
11	Inactivación de células libres de <i>L. lactis</i> UQ2 por la exposición a 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2	32

	min a 30°C.	
12	Concentración mínima bactericida (CMB) de AEN para <i>L. lactis</i> UQ2.	33
13	Inactivación de células libres de <i>L. monocytogenes</i> Scott A por la exposición a 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 min a 30°C.	34
14	Inactivación de células libres de <i>L. monocytogenes</i> Scott A por la exposición a 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 min a 4°C.	35
15	Concentración mínima bactericida (CMB) de AEN para <i>L. monocytogenes</i> Scott A.	35
16	Preacondicionamientos para la formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A sobre vidrio y acero inoxidable.	36
17	Inactivación de células de <i>L. lactis</i> UQ2 formadoras de biopelículas sobre vidrio y acero inoxidable por la exposición a 500 ppm de AEN por 1, 5, 30 y 45 min.	37
18	Inactivación de células de <i>L. monocytogenes</i> Scott A formadoras de biopelículas sobre acero inoxidable por la exposición a 50, 100, 250 y 500 ppm de AEN por 10 min.	38
19	Inactivación de células de <i>L. monocytogenes</i> Scott A formadoras de biopelículas sobre vidrio por la exposición a 60 y 65 ppm de AEN por 10 min.	39
20	Inactivación de células de <i>L. monocytogenes</i> Scott A formadoras de biopelículas sobre acero inoxidable por la exposición a 60 y 65 ppm de AEN por 10 min.	40
21	Tinción con cristal violeta de biopelículas de <i>L. lactis</i> UQ2. Proceso de formación de la biopelícula en un periodo de 5 días. a) Día 1, b) día 2, c) día 3, d) día 4, e) día 5. Imagen observada con objetivo 1000x.	41

22	Hibración fluorescente in situ de biopelículas de <i>L. lactis</i> UQ2 con sonda Strc493 al quinto día de su formación; a y b en superficie de vidrio, c y d en superficie de acero inoxidable. Imagen observada con objetivo 1000x.	42
23	Hibración fluorescente in situ de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A con sonda Lis637 al quinto día de su formación; a y b en superficie de vidrio, c y d en superficie de acero inoxidable. Imagen observada con objetivo 1000x.	43
24	Micrografía de acero inoxidable austenítico, tipo 301.	52

## RESUMEN

La contaminación microbiológica representa un elevado costo anual a las industrias de alimentos por la alta carga microbiana e incluso la presencia de patógenos. Estos microorganismos han evolucionado de tal forma que logran organizarse y aprovechar los productos que se ofrecen dentro de su comunidad denominada biopelícula. Las biopelículas son comunidades microbianas que se adhieren a las superficies por la secreción de polímeros extracelulares (SPE). El desarrollo de éstas consiste en la adhesión, formación de microcolonias, producción de SPE, maduración y dispersión de microcolonias. El objetivo de este proyecto fue la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* Scott A y *Lactococcus lactis* UQ2 sobre vidrio y acero inoxidable para estudiar su desarrollo y evaluar la eficacia del agua electrolizada neutra (AEN) en la inactivación de dichas bacterias. La inactivación de células libres de *L. lactis* UQ2 se logró a una concentración de 30 ppm por 0.5 min a 30°C y para *L. monocytogenes* se logró a 15 ppm por 1.5 min o 20 ppm por 0.5 min a 30°C y 30 ppm por 0.5 min a 4°C. En biopelículas, la inactivación para *L. lactis* UQ2 se logró a 500 ppm por 45 min en vidrio y 500 ppm por 1 min en acero inoxidable, mientras que para *L. monocytogenes* Scott A se requirieron 65 ppm por 10 min en vidrio y en acero, o bien 60 ppm por 15 min en acero inoxidable. El AEN es un desinfectante efectivo contra células libres y en forma de biopelícula para ambos microorganismos, donde las células en biopelícula son más resistentes que las células libres.

## I. INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiológica cuesta millones de pesos anualmente a las industrias de alimentos en términos del rechazo al producto por los consumidores debido a la alta carga microbiana, la presencia de esporas e incluso la presencia de patógenos.

A pesar de las cuidadosas operaciones en las plantas procesadoras de alimentos, es muy difícil e incluso imposible producir alimentos libres de microorganismos, a menos que el proceso incluya una etapa de esterilización. También es cierto que los microorganismos por sí solos, salvo en algunas ocasiones, no son capaces de generar daños importantes en un organismo viviente porque son susceptibles a los factores adversos del medio en que se encuentran. Sin embargo, estos seres microscópicos han evolucionado de tal forma que logran organizarse y convivir con especies diferentes, aprovechando los productos que se ofrecen dentro de su comunidad ecológica denominada biopelícula.

En muchas formas la biopelícula representa una estrategia de supervivencia, pues proporciona una protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana y cuenta con un sistema de canales que le permiten establecer un vínculo con el medio externo para hacer intercambio de nutrientes y eliminar metabolitos de desecho.

La presencia de biopelículas en el procesamiento de alimentos puede tener como consecuencia diversos problemas incluyendo la reducción de la velocidad de flujo de fluidos, así como la reducción en la transferencia de calor, ocasionando el llamado “bioensuciamiento”, y la contaminación del producto final. La mayor preocupación en la contaminación del producto final es la posibilidad de que ésta incluya patógenos para el ser humano. Diversos patógenos tales como *Salmonella* entérica serovar *thyphimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, y *L. monocytogenes*, han sido asociados a la producción de biopelículas.



En general, la remoción de bacterias en biopelículas es difícil por métodos convencionales de sanitización, debido a que las bacterias que componen una biopelícula, se encuentran en estado metabólico mínimo en las capas más profundas. Esta condición impide la acción de antibióticos que actúan a nivel de la síntesis de la pared bacteriana o producción de proteínas, haciendo a las bacterias formadoras de la biopelícula de 100 a 1000 veces más resistentes que las células libres. Debido a la alta resistencia de las biopelículas a los desinfectantes, y por tanto al riesgo microbiano que representan en la industria de alimentos, es importante estudiar la formación y control de las biopelículas de *L. monocytogenes* sobre dos superficies de contacto mediante el uso de agua electrolizada neutra (AEN) como agente bactericida. También se desea estudiar el efecto sobre biopelículas de *L. lactis* UQ2, para facilitar el uso de técnicas microscópicas en su formación y control.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Biopelículas formadas por bacterias

Desde los tiempos de Pasteur y Koch, los trabajos microbiológicos han estudiado los microorganismos en cultivos puros creciéndolos en caldos nutritivos. Sin embargo, en la actualidad se sabe que las bacterias en medio natural prefieren asociarse y crecer en forma de biopelícula que como células libres (Sutherland, 2001; Hall-Stoodley y Stoodley, 2005).

La importancia de las biopelículas se comenzó a estudiar a mediados de la década de 1970, cuando se hablaba de los efectos en los diversos ambientes naturales de estas organizaciones no muy bien comprendidas. Dos décadas después, el desarrollo de técnicas microscópicas más avanzadas permitieron entender la ultraestructura y dinámica de estas asociaciones. Hoy en día, el estudio de las biopelículas se hace cada vez más extenso y complejo en cada una de las áreas donde se trabaja (Betancourth y col., 2004).

#### II.1.1 Definición

Las biopelículas pueden ser definidas como complejas comunidades de microorganismos viables y no viables adheridos a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas, rodeadas por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) producidas por ellas mismas (Carpentier y Cerf., 1993).

#### II.1.2 Características

Las biopelículas en la naturaleza tienen un alto grado de organización, debido a que funcionan por su comportamiento colectivo y su actividad coordinada, la cual ayuda a la supervivencia de células en ambientes agotadores. Las biopelículas pueden medir desde unos micrómetros hasta algunos milímetros y contienen del 90 al 97% de agua (Brooks y Flint, 2008), pueden existir en comunidades de especies solas o múltiples, formar una sola capa, una estructura tridimensional, o tomar la forma de agregados como flóculos o gránulos (Chmielewski y Frank, 2003).

El Cuadro 1 resume las características de las biopelículas. Una de estas características es la heterogeneidad, lo que las hace organizaciones únicas que pueden estar conformadas por bacterias, hongos y protozoos. Se ha visto entonces, que los microorganismos al ser variados dentro de esta organización presentan diferentes microambientes de pH, tensión de oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno.

Cuadro 1. Características de las biopelículas (Betancourth y col., 2004).

---

Adherencia
Heterogeneidad
Diferentes microambientes (pH, tensión O <sub>2</sub> , concentración de iones, carbono y nitrógeno)
Sistema circulatorio primitivo
Resistencia a las defensas del hospedero, agentes antimicrobianos y detergentes
Percepción en quórum

---

La hidrodinámica juega un papel importante en el desarrollo de la biopelícula, pues estas organizaciones se desarrollan en una interfase líquido-sólido donde la velocidad de flujo que lo atraviesa influye en el desprendimiento físico de los microorganismos. Además, posee un sistema de canales que les permiten el transporte de nutrientes y desechos. Otra característica es su resistencia a las defensas del huésped y agentes antimicrobianos, donde sólo los microorganismos más superficiales de la biopelícula se ven afectados. Cuando se liberan células de la biopelícula, éstas tienen la capacidad de viajar y depositarse en nuevos nichos de colonización manteniendo las mismas características de una biopelícula adherida a una superficie. Finalmente, los microorganismos se comunican unos con otros, lo cual se le ha denominado percepción en quórum e involucra la regulación y expresión de genes específicos a través de moléculas de señalización que median la comunicación intercelular (Betancourth y col., 2004).

Las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos teicóicos nucleicos y otras sustancias poliméricas (Sutherland, 2001). La función de las sustancias poliméricas extracelulares es la de proporcionar protección a los microorganismos que forman la biopelícula por que concentran las sustancias nutritivas, previniendo el acceso de antimicrobianos, secuestrando metales y toxinas y previniendo la desecación (Carpentier y Cerf., 1993).

### II.1.3 Etapas de formación

La formación de la biopelícula consiste inicialmente en la adhesión, formación de la microcolonia y la producción de las sustancias poliméricas extracelulares seguido de la maduración y dispersión de las microcolonias (Daved y O'Toole, 2000). Este proceso se ilustra en la Figura 1, donde la transición de las bacterias de su forma libre a adherida se desencadena por señales ambientales. Los ecosistemas naturales generalmente tienen un bajo contenido de nutrientes y la formación de las biopelículas bajo condiciones desfavorables es una importante adaptación para la supervivencia de los microorganismos (Mittleman, 1998).

#### II.1.3.1 Adhesión

La adhesión de las bacterias a la superficie puede ser activa o pasiva dependiendo de la movilidad de la célula. La adhesión pasiva está dada por la gravedad, difusión y la dinámica de fluidos. La adhesión activa, involucra la movilidad de las células bacterianas y la presencia de características de las bacterias tales como flagelos, proteínas de adhesión, cápsula y la carga superficial (Kumar y col., 1998). La adhesión se lleva a cabo en dos etapas: adhesión reversible y adhesión irreversible (Mittleman, 1998).

#### II.1.3.1 Adhesión

La adhesión de las bacterias a la superficie puede ser activa o pasiva dependiendo de la movilidad de la célula. La adhesión pasiva está dada por la gravedad, difusión y la dinámica de fluidos. La adhesión activa, involucra la movilidad de las células

bacterianas y la presencia de características de las bacterias tales como flagelos, proteínas de adhesión, cápsula y la carga superficial (Kumar y col., 1998). La adhesión se lleva a cabo en dos etapas: adhesión reversible y adhesión irreversible (Mittleman, 1998).

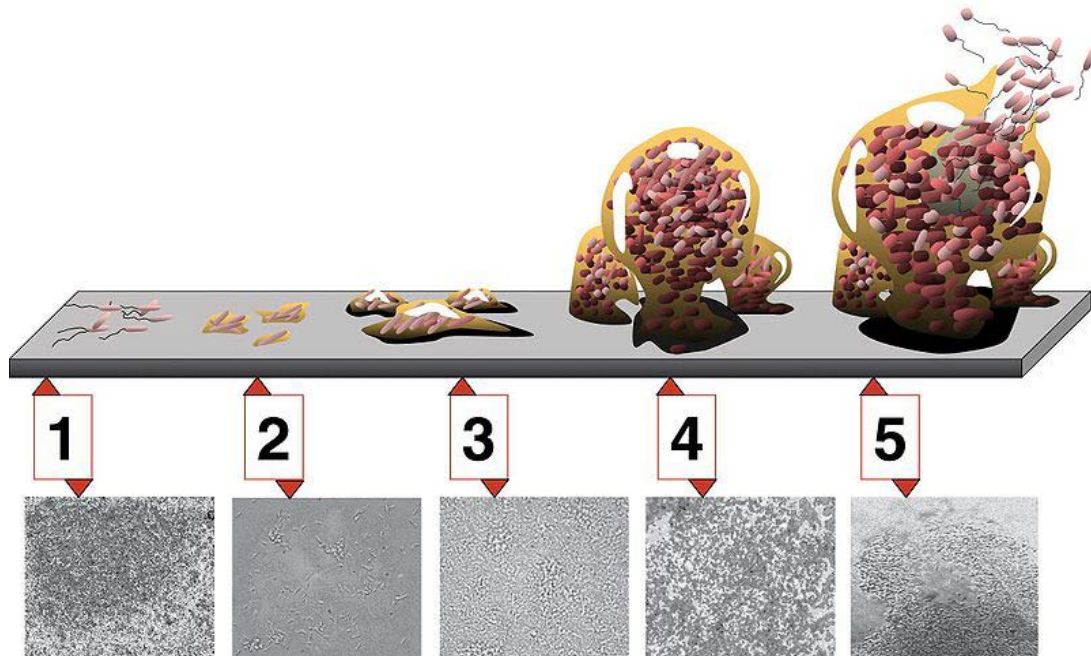


Figura 1. Proceso de formación de la biopelícula. (1) Adhesión; (2) formación de microcolonias; (3) secreción de SPE; (4) maduración; (5) dispersión de células (Davis, 2007).

#### II.1.3.1.1 Adhesión reversible

La adhesión reversible inicia con la interacción de la bacteria con el sustrato. Esto involucra fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Durante esta etapa el microorganismo sigue presentando movimiento browniano y es fácil su remoción por aplicación de fuerza (Brooks y Flint, 2008).

#### II.1.3.1.2 Adhesión irreversible

La adhesión irreversible resulta del anclaje de apéndices y/o la producción de sustancias poliméricas extracelulares. Las fuerzas de repulsión usualmente previenen directamente el contacto de la bacteria con el sustrato (frecuentemente

tanto como las células bacterianas como el sustrato están cargados negativamente). Las interacciones entre los apéndices y el sustrato son dipolo-dipolo, puentes de hidrogeno, fuerzas hidrofóbicas y enlaces iónicos y covalentes que suelen establecerse en pocas horas de contacto. La remoción de la biopelícula en esta etapa es difícil y requiere el uso de una gran fuerza, enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes y/o calor que rompan químicamente la adhesión. Diversos estudios indican que la adhesión reversible puede ocurrir en un tiempo de 20 min a 4 horas a 20°C (Sutherland, 2001).

La adhesión microbiana es afectada por propiedades físicas y químicas de las células, por la composición del medio que las rodea (Chmielewski y Frank, 2003) y por el tipo de sustrato, ya que las bacterias se adhieren en vidrio y acero inoxidable (materiales hidrofílicos) uniformemente formando una monocapa, mientras que en superficies hidrofóbicas como el nylon y el estaño (materiales hidrofóbicos) tienden a formar agregados en forma de grumos; también está influenciada por propiedades fisicoquímicas de sus superficies, como la tasa y condiciones de crecimiento (tiempo y temperatura). Las superficies de las bacterias tienen una carga negativa y usualmente se comportan como partículas hidrofóbicas, pero cierto grado de hidrofobicidad puede cambiar dependiendo de la fase de crecimiento. La hidrofobicidad generalmente decrece conforme incrementa la tasa de crecimiento. Herald y Zottola (1998), demostraron que la *Listeria* y *Yersinia* mostraban un incremento en la adhesión cuando los microorganismos se encontraban en la mayor actividad metabólica. Para la *Listeria*, la actividad metabólica y las condiciones óptimas de crecimiento son 30°C y pH 7.

#### II.1.3.1.3 Topografía de las superficies

El material más comúnmente utilizado en la fabricación de equipos y utensilios en las empresas de alimentos es el acero inoxidable; otros materiales como el hule, teflón y nylon también son utilizados en la industria para la unión de diversos utensilios que forman parte de equipos, pero éstos tienden a desgastarse con el uso continuo, lo cual incrementa los refugios para la materia orgánica y bacterias,

permitiendo además del crecimiento de éstas y su protección contra agentes desinfectantes.

#### II.1.3.1.4 Preacondicionamiento del sustrato

El preacondicionamiento es la absorción de moléculas orgánicas e iones cargados; éste se lleva a cabo sumergiendo la superficie limpia en una solución y suele ocurrir en segundos de exposición. Numerosos estudios demuestran que la adhesión de bacterias ocurre de mejor manera en superficies preacondicionadas con presencia de iones (Chmielewski y Frank, 2003).

McEldowney y Fletcher (1987), señalaron que la presencia de una capa de materia orgánica en una superficie puede promover la adhesión de las células bacterianas y la máxima absorción de materia orgánica ocurre en superficies con alta energía libre. Hood y Zottola (1997), observaron el efecto de la adhesión bacteriana usando acero inoxidable expuesto a leche entera, leche con chocolate y leche diluida, y demostraron que la adhesión de *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* fue inhibida por el preacondicionamiento con leche entera y leche con chocolate, pero fue favorecida cuando se uso leche diluida.

La población inicial que se adhiere a la superficie puede llevar a cabo un preacondicionamiento, esto se debe al cambio de la composición de la superficie por lo que las siguientes especies se van a adherir mediante la asociación célula a célula (Chmielewski y Frank, 2003). McEldowney y Fletcher (1987) demostraron que en algunos casos, la adhesión de una segunda especie le confiere mayor estabilidad a la biopelícula. Hood y Zottola (1997) demostraron que *L. monocytogenes* tenía mayor probabilidad de adhesión en acero inoxidable en presencia de *Pseudomonas fragi*.

#### II.1.3.2 Formación de microcolonias y secreción de SPE

La formación de la microcolonia procede de la adhesión irreversible de las células bacterianas y resulta de la agregación simultánea y el crecimiento de los

microorganismos, lo cual se acompaña de la secreción de SPE, las cuales son producidas en respuesta a la adhesión y estímulos ambientales como la presión atmosférica, pH, temperatura y la falta de nutrientes.

La composición de las SPE no se conoce con exactitud, pero se sabe que se forman por una mezcla de polímeros. (Chmielewski y Frank, 2003). Estudios realizados sobre bacterias en medio natural muestran que la agregación antes mencionada puede involucrar la comunicación entre células libres del medio mediante el mecanismo conocido como percepción en quórum (Betancourth y col., 2004).

#### II.1.3.3 Maduración de la biopelícula

Si las condiciones son favorables para el crecimiento y aglomeración de las células bacterianas, la biopelícula puede mostrar una estructura organizada, éste proceso se le conoce como maduración. La maduración de la biopelícula puede consistir en una capa de células en un polímero extracelular poroso o multicapas con microcolonias cubiertas de SPE y con canales de agua (Chmielewski y Frank, 2003). En la Figura 2 se muestran ejemplos de la maduración de la microcolonia.

Cuando la biopelícula madura, los microorganismos se adaptan a los nutrientes, oxígeno y cambios en la población y se forman microcolonias separadas unas de otras por canales de agua que permiten la distribución e intercambio de disolventes orgánicos, metales y metabolitos. La densidad de la matriz incrementa en el núcleo mientras que las capas superficiales permanecen porosas (Bishop, 1997). La mayor parte de las bacterias con mayor actividad metabólica permanecen en las capas superiores cerca de los canales de agua (Zhang y Bishop, 1994).

#### II.1.4 Modelos estructurales de biopelículas

Varios modelos estructurales han sido propuestos para explicar el desarrollo y propiedades de las biopelículas. Estos modelos se basan en observaciones de la estructura de biopelículas y se estudian por técnicas microscópicas.



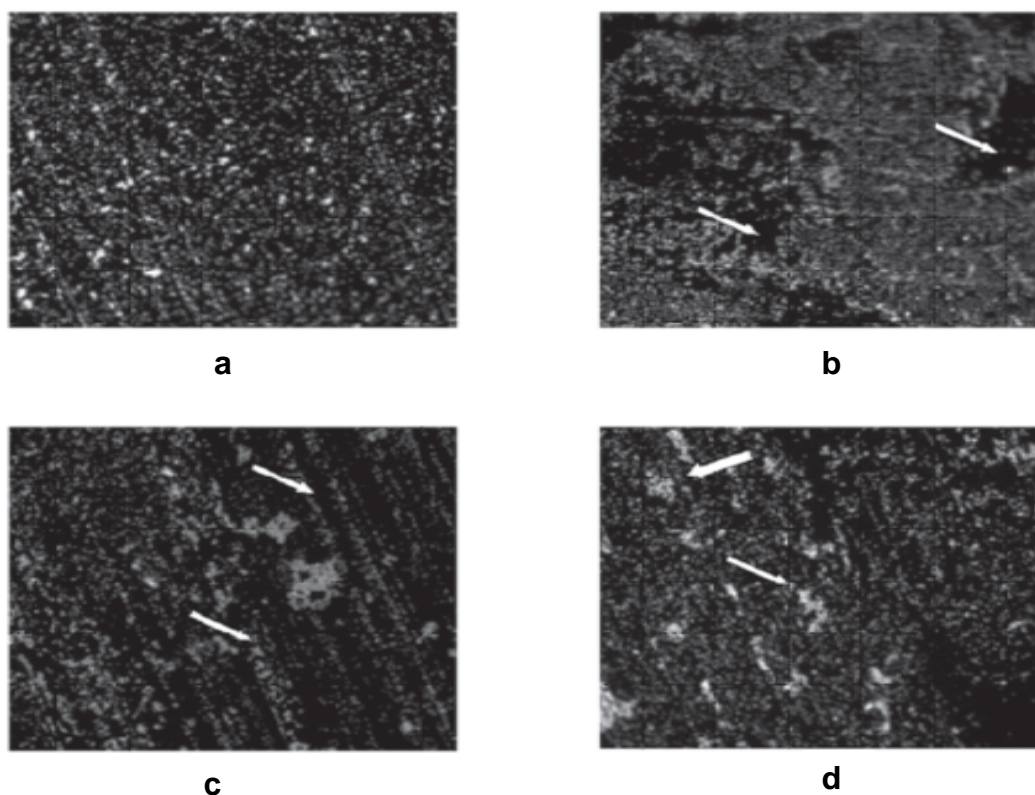


Figura 2. Micrografías epifluorescentes de biopelículas producidas sobre acero inoxidable por 4 cepas de *L. monocytogenes*. (a) Crecimiento de la biopelícula; (b) canales dentro de la biopelícula; (c) crecimiento en las estrías del acero inoxidable (d) multicapas de microcolonias. (Chmielewski y Frank, 2003). La referencia no menciona dimensiones.

#### II.1.4.1 Teoría del modelo monocapa

La primera teoría estructural de la biopelícula es un modelo continuo, el cual describe la biopelícula como lisa, plana y homogénea. Este modelo fue usado para predecir la tasa de la actividad química de las biopelículas basado en la difusión, los efectos físicos del flujo de agua, la presión y la tasa de desprendimiento de las células en sistemas de distribución de agua (Bishop, 1997).

#### II.1.4.2 Teoría del modelo multicapa – 3D

El segundo tipo de modelo estructural se definió como un modelo de mosaico heterogéneo y fue descrito usando microscopía de contraste diferencial (MCD).

Este modelo denominado enjambre, describe a la biopelícula como un mosaico heterogéneo con organismos apilados y unidos entre sí por SPE (Wimpenny y col., 2000). Está basado en conceptos fisiológicos simples, los microorganismos metabolizan sustratos, excretan, mantienen un nivel de energía, se dividen o mueren dependiendo de la disponibilidad de nutrientes; si una célula se divide, empuja a otras células hacia un lado debido a la falta de espacio; si una célula muere, sus componentes son reciclados para ser usados como nutrientes. El modelo asume que las células de la biopelícula tienen una alta afinidad entre ellas, causando que permanezcan aglutinadas.

#### II.1.4.3 Concepto actual de biopelícula

El modelo que actualmente rige el concepto de biopelícula, es un modelo que se basa en la evidencia provista por la microscopía láser de barrido confocal. Esta técnica muestra la estructura de la biopelícula como un champiñón o tulipán (Wimpenny y col., 2000) y en su estructura forma de torres, pedestales y canales de agua, lo cual se puede observar en la Figura 3. La parte superior de la estructura tiene forma de champiñón con canales de agua en el tallo. El modelo propone que las células en el perímetro crecen rápidamente, mientras que el crecimiento de las células en el interior es lento. Las torres de los champiñones pueden tener estelas, las cuales pueden romperse y liberar células para colonizar nuevas superficies. Los microorganismos en la biopelícula pueden competir, operar independientemente, cooperar entre ellos o incluso ser predadores (Chmielewski y Frank, 2003). En un estudio realizado por Zhang y Bishop (1994), se demostró que existe un rango de porosidad en las biopelículas maduras que va desde 89% en la parte superior hasta 5% en las capas del fondo, lo cual ayuda a confirmar este modelo.

#### II.2 Resistencia de las células en biopelícula a la limpieza y agentes sanitizantes

El proceso de limpieza puede remover el 90% de las bacterias asociadas a la superficie, pero no tiene la capacidad para inactivarlas, por lo tanto estas bacterias

pueden redepositarse en otras áreas donde existan agua y nutrientes para formar la biopelícula; es por esto que la limpieza debe estar seguida de una sanitización.

Las biopelículas tienen mayor resistencia a la limpieza y a los agentes desinfectantes que las células libres (Brooks y Flint, 2008), esto puede deberse en gran medida a las SPE, lo cual puede apagar o limitar la penetración de los agentes sanitizantes (Meyer, 2003).

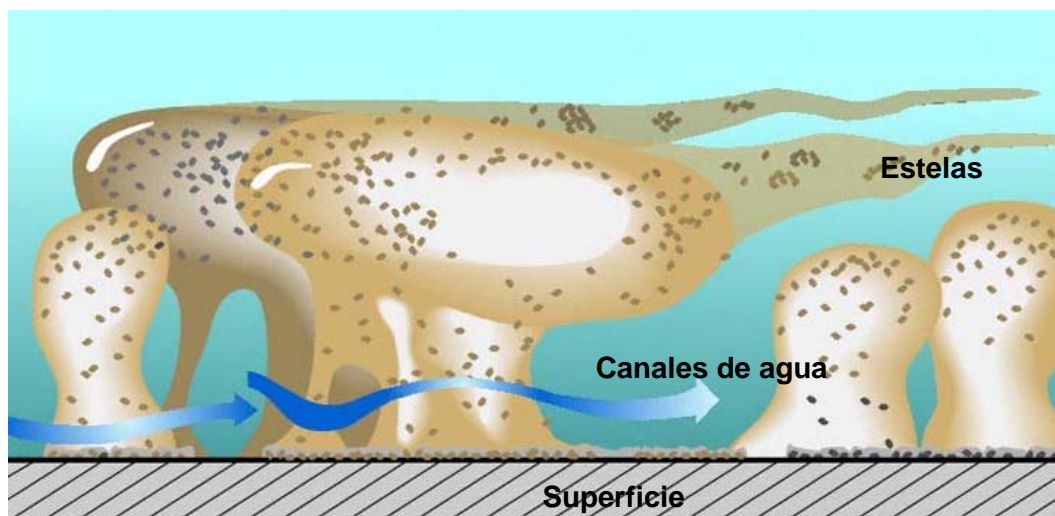


Figura 3. Diagrama de formación de la biopelícula de acuerdo al modelo estructural actual o champiñón (Stewart, 2008).

En estudios realizados por Brooks y Flint (2008), sobre biopelículas en acero inoxidable se encontró que la presencia de materia orgánica (leche) reduce significativamente la cantidad de log que se inactivan por el tratamiento con agentes sanitizantes tales como dióxido de cloro, ácido peracético/peróxido de hidrógeno y sales cuaternarias de amonio.

### II.3 *Lactococcus lactis*

*L. lactis* pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas, las cuales constituyen un gran grupo natural de bacilos y cocos Gram positivos, inmóviles no esporulados que al fermentar azúcares forman principalmente ácido láctico. El primer cultivo

puro bacteriano obtenido y descrito científicamente fue *L. lactis* en 1873 por Joseph Lister. Se puede reconocer como la bacteria láctica por excelencia de la leche. Es la BAL más frecuentemente utilizada como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos cultivados, en particular quesos y leches diversas. Es una bacteria Gram positiva, catalasa negativa, homofermentativa, crece a 10°C a 40°C, con una concentración del 4% (p/v) de cloruro de sodio y capaz de fermentar azúcares en ácido láctico. La cepa *L. lactis* UQ2 tiene la capacidad de formar biopelículas (Fernández, 2000; García-Almendárez y col., 2008).

#### II.4 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* es un patógeno con la habilidad de proliferar en ambientes húmedos y fríos, lo cual es ideal para la formación de la biopelícula (Chmielewski y Frank, 2003). Es una bacteria contaminante de una gran variedad de productos alimenticios incluyendo pescado, mariscos, carne, quesos suaves, leche cruda y vegetales. Comparado con otros patógenos, *L. monocytogenes* es único en la resistencia que presenta a las condiciones adversas que normalmente impiden el crecimiento de otras bacterias (Smoot y Pierson, 1998).

El número reconocido de especies de *Listeria* son cinco: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua* y *L. welshimeri*. Además de las especies mencionadas también se incluyen *L. grayi* y siete especies de *L. murrayi*. *L. monocytogenes* es un patógeno para humanos y animales, *L. ivanovii* es patógeno para animales y el resto de las especies no se consideran como patógenos (Martin y Fisher, 1999).

*L. monocytogenes* es un bacilo pequeño (0.5-2.0 µm de largo y 0.4-0.5 µm de diámetro), es un patógeno ubicuo, Gram-positivo, anaerobio facultativo no esporulado, catalasa positivo y oxidasa negativo. Cuando crece a una temperatura de 25°C presenta movilidad intermitente, pero a una temperatura de 37°C no la presenta. Cuando la bacteria es inoculada en agar e incubada a 25°C, se presenta el efecto sombrilla, el cual tiene una longitud en la superficie de 3-5 mm. El rango

de temperatura en el que puede crecer es muy extenso, desde <math>1^{\circ}\text{C}</math> hasta <math>50^{\circ}\text{C}</math>, donde el óptimo de crecimiento se encuentra entre <math>30^{\circ}\text{C}</math> y <math>37^{\circ}\text{C}</math>, y puede sobrevivir a temperaturas de congelación (Fisher y col., 2000). Este patógeno puede crecer en altas concentraciones de sal, como en medios con una concentración de 10% NaCl. El pH óptimo de crecimiento es de 7.0, pero puede crecer en un rango entre 4.0 y 9.5. La mínima actividad de agua necesaria para su crecimiento se encuentra en un rango entre 0.90 a 0.97. Crece adecuadamente en un medio rico en nutrientes como lo es el caldo soya tripticasa y en el caldo infusión cerebro corazón (Faber y Peterkin, 2000).

#### II.4.1 Listeriosis

La listeriosis es una enfermedad causada por la ingesta de células de *L. monocytogenes*; puede infectar a personas de todas las edades, pero ocurre más frecuentemente en individuos que tiene su sistema inmune comprometido. La incidencia de los brotes de listeriosis es muy baja, sin embargo esta enfermedad tiene una alta tasa de mortalidad en comparación con otros patógenos (Faber y Peterkin, 2000). La mayoría de las muertes asociadas a éste patógeno involucra fetos, recién nacidos o personas inmunocomprometidas.

Los síntomas de la listeriosis en personas con un sistema inmune deprimido incluyen abortos espontáneos, septicemia y meningitis. En adultos sanos, la infección es usualmente asintomática pero puede causar síntomas leves similares a los de la influenza, como fiebre, fatiga, náuseas, vómito, diarrea, calambres y malestar generalizado (Martin y Fisher, 1999).

#### II.5 Importancia de las biopelículas en la industria de alimentos

La mayor preocupación de la presencia de microorganismos asociados en forma de biopelículas en la industria de los alimentos es considerado como un evidente riesgo a la salud, debido a que estas comunidades pueden contener microorganismos patógenos y los pueden proteger contra la desecación, antimicrobianos y agentes sanitizantes (Roshni y col. 2009).

Diversos estudios han demostrado que las células de *L. monocytogenes* en biopelícula son resistentes al cloro, ácidos orgánicos, compuestos cuaternarios de amonio por lo que la inadecuada limpieza y sanitización de las superficies de los equipos en los cuales se procesan alimentos puede permitir la propagación del patógeno en toda la planta procesadora de alimentos (Kim y col., 2000b).

#### II.6 Antimicrobianos usados contra biopelículas de *L. monocytogenes*

Debido a las características que la biopelícula le confiere a las bacterias y el riesgo que éstas representan en el ambiente del procesamiento de los alimentos, se han hecho diversos estudios para evaluar el efecto de diferentes desinfectantes sobre biopelículas de *L. monocytogenes*.

Baumann y col. (2009), determinaron la eficacia de la sonicación y del ozono (individualmente y la combinación) para remover dichas biopelículas sobre acero inoxidable y encontraron que las mejores condiciones para la remoción es aplicar los tratamientos combinados por 30 s a 0.5 ppm con una reducción de 7.31 log. Otro estudio realizado por Roshni y col. (2009), evaluaron el efecto del clorhidrato del octenidina a 10 y 20mM por 0, 2, 5 y 10 min de exposición sobre acero inoxidable y encontraron que la exposición de éstas a 20 mM por 10 s o 10mM por 5 min son necesarios para inactivar completamente las biopelículas. Asimismo Yang y col. (2008), evaluaron la eficacia de diferentes sanitizantes sobre superficies de polietileno de alta densidad (HDPE) y encontraron que el ácido láctico (0.18%) fue el más efectivo y las sales cuaternarias de amonio (pH 6.24) fue el menos efectivo. Las biopelículas fueron crecidas durante 7 días en cupones de HDPE (rugoso y liso) y los sanitizantes se aplicaron conforme especificaciones del fabricante. El ácido láctico se aplicó durante 5 min y se observó una reducción de 5 log. Una alternativa para la inactivación de biopelículas es el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) en inhibición competitiva, como lo reportado por García-Almendárez y col. (2007), donde se evaluó la inhibición competitiva de *L. monocytogenes* y *L. lactis* sobre acero inoxidable; se encontró una reducción de 5 log de después de 6 h a 37°C de antagonismo.

## II.7 Agua electrolizada

La tecnología del agua electrolizada ha sido usada en varios campos, incluyendo el campo de la agricultura, cría de ganado, esterilización médica, sanitización de alimentos y como antimicrobiano.

Diversos sanitizantes son utilizados para la desinfección de frutas y verduras, entre los que se encuentran las soluciones con cloro; éstos pueden reducir la carga bacteriana pero no eliminan patógenos de la superficie. Debido a lo mencionado anteriormente estudios recientes se han enfocado al efecto bactericida del agua electrolizada ácida en varios patógenos causantes de ETA's (Venkitanarayanan y col., 1999).

### II.7.1 Características

El agua electrolizada es producto de un nuevo concepto descubierto en Japón. La mayor ventaja del uso del agua electrolizada para la inactivación de bacterias es que es producida con agua pura sin añadir agentes químicos excepto cloruro de sodio (Kim y col., 2000a).

El agua electrolizada es generada durante la electrólisis de solución diluida de cloruro de sodio colocada en una celda de electrólisis, como se muestra en la Figura 4, en la cual una membrana separa el ánodo del cátodo. El voltaje entre los electrodos es generalmente entre 9 y 10 V. Se produce dos tipos de agua al ser sometidos los electrodos a una corriente de voltaje directa. El agua que proviene del ánodo normalmente tiene un pH de 2.7 o menor, el potencial óxido-reducción es de 1100mV y la concentración de cloro residual, en forma de ácido hipocloroso, es de 10 a 90 ppm. El agua que proviene del cátodo tiene un pH de 10 a 13, el potencial óxido-reducción es de -800 a -900 mV (Venkitanarayanan y col., 1999).

El agua electrolizada que proviene del ánodo es llamada agua electrolizada ácida y por su alto potencial de óxido-reducción y su contenido de ácido hipocloroso se utiliza como bactericida. El agua electrolizada que proviene del cátodo es llamada

agua electrolizada básica y tiene un fuerte potencial de reducción, lo que conduce a una reducción de radicales libres en sistemas biológicos y pueden ser útil en el tratamiento médico (Kim y col., 2000a). El agua electrolizada neutra con un pH de 7 a 8 y un potencial de oxido reducción de 750 mV, es producida por la mezcla de las soluciones provenientes del ánodo y del cátodo o por la producción del agua electrolizada en una celda sin membrana (Hricova y col., 2008).

### II.7.2 Producción

El agua electrolizada es generada durante la electrólisis de solución diluida de cloruro de sodio colocada en una celda de electrólisis, como se muestra en la Figura 4, en la cual una membrana separa el ánodo del cátodo. El voltaje entre los electrodos es generalmente entre 9 y 10 V. Durante la electrólisis, el cloruro de sodio en agua desionizada se disocia en los iones negativos cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y en los iones positivos sodio ( $\text{Na}^+$ ) e hidrogeno ( $\text{H}^+$ ). El cloro y el hidroxilo son absorbidos por el ánodo, donde pierden un electrón y se convierten en oxígeno gas ( $\text{O}_2$ ), cloro gas ( $\text{Cl}_2$ ), ion hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) y ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ). Por otra parte en la sección del cátodo, cada ion de sodio cargado positivamente recibe un electrón y se convierten en sodio metálico ( $\text{Na}_2$ ), el cual a su vez se combina con moléculas de agua para formar hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) y gas hidrogeno ( $\text{H}_2$ ) (Hricova y col., 2008; Venkitanarayanan y col., 1999).

### II.7.3 Mecanismo de acción

El principal componente del agua electrolizada es el ácido hipocloroso, cuya fórmula química es  $\text{HClO}$ ; se forma cuando se disuelve el cloro gaseoso ( $\text{Cl}_2$ ) en agua. El ácido hipocloroso actúa inactivando células microbianas por la inhibición de la oxidación de glucosa debido a que se oxidan los grupos sulfhidrilo de ciertas enzimas importantes en el metabolismo de los carbohidratos (Kim y col., 2000a).

El dióxido de cloro actúa a nivel de la membrana celular y no reacciona con la materia orgánica, oxida los fenoles y no reacciona con las aminas ni con los hidrocarburos que tienen comprobado efecto cancerígeno (Fernández, 2000).





### **III. HIPÓTESIS**

El agua electrolizada neutra tiene efecto bactericida contra biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A y *L. lactis* UQ2 formadas sobre acero inoxidable y vidrio.

## IV. OBJETIVOS

### IV. 1 General

Estudiar el desarrollo y control de biopelículas y células libres de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A sobre dos superficies: vidrio y acero inoxidable.

### IV. 2 Específicos

- Diseñar la metodología para el desarrollo de biopelículas de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A sobre vidrio y acero inoxidable.
- Estudiar la cinética de crecimiento de las biopelículas de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A por técnicas microscópicas.
- Implementar el uso de técnicas microbiológicas, microscópicas y moleculares para determinar la presencia de biopelículas.
- Evaluar el efecto bactericida del agua electrolizada neutra sobre células libres y biopelículas de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Biológicos

- *L. lactis* UQ2

La cepa fue provista por la División de Investigación y Posgrado en Alimentos, UAQ. Esta cepa fue aislada de un escrutinio de alimentos lácteos (queso fresco) de la región de Querétaro en el laboratorio de Biotecnología de Alimentos, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

- *L. monocytogenes* Scott A

Cepa donada por el Laboratorio de Microbiología. Departamento de Ciencia de Alimentos y Nutrición Humana de la Universidad de Illinois en Urbana- Champaign.

#### V.1.2 Antimicrobiano

- Agua electrolizada neutra

Agua activada DESY<sup>®</sup> con una concentración de oxidantes de 500 ppm, pH 6.5-7.5 y REDOX de 800-1000 mV.

### V.2 Métodos

#### V.2.1 Microorganismo y condiciones de crecimiento

##### V.2.1.1 Activación y preparación del inóculo de *L. lactis* UQ2

La cepa se encontraba en conserva a -70°C en chaquiras de vidrio. Su activación se realizó en 5 mL de caldo MRS (Oxoid) por 18 h a 30°C. Al finalizar el tiempo de incubación, el caldo con la cepa se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 5 mL de solución salina 0.85% NaCl (Baker), y se centrifugó nuevamente para lavar las células a las mismas condiciones. La pastilla se resuspendió en 5 mL de la misma solución salina (García-Almendárez y col., 2008).

### V.2.1.2 Activación y preparación del inóculo de *L. monocytogenes* Scott A

La cepa se encontraba en conserva a -70°C en chaquiras de vidrio. Su activación se realizó en 10 mL de caldo soya tripticaseína (CST, Bioxon) por 18 h a 37°C en agitación a 130 rpm y posteriormente 100 µL de éste caldo se resuspendió en 90 mL de CST por 18 h a 37°C en agitación a 130 rpm. Al finalizar el tiempo de incubación, 30 mL del caldo con la cepa se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 30 mL de solución salina 0.85% NaCl, y se centrifugó nuevamente para lavar las células a las mismas condiciones. La pastilla se resuspendió en 30 mL de la misma solución salina.

## V.2.2 Preparación de las superficies

### V.2.2.1 Superficies de vidrio

Para el crecimiento de las biopelículas se utilizaron portaobjetos de vidrio, delimitando un área de 2.54 cm x 2.54 cm. Los portaobjetos se lavaron con detergente (Dawn) y se enjuagaron con agua destilada. Se colocaron cuatro portaobjetos en una caja Petri y se esterilizaron en autoclave (LAB-MED) por 15 min a 121°C.

### V.2.2.2 Superficies de acero inoxidable

Para el crecimiento de las biopelículas se utilizaron placas de acero inoxidable tipo 304, 2B (rugosidad promedio de 0.1 – 0.5 mm, laminado en frío) de 2.54 cm x 2.54 cm. Las placas se lavaron con el detergente y se enjuagaron con agua destilada, posteriormente se sumergieron durante 10 min en agua destilada caliente para remover cualquier material orgánico. Se colocaron cuatro placas en una caja Petri y se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121°C.

## V.2.3 Preacondicionamiento de las superficies

Las placas de ambos materiales se pre-acondicionaron con una solución de L-lisina (Sigma) 0.1 mM (para las superficies de vidrio) o con una solución de leche descremada (Nestlé) 0.02% (para las superficies de acero inoxidable). Se colocaron 100 µL de la solución sobre la placa y se extendió con un asa de platino

estéril, se dejó actuar por 5 min y se retiró el exceso.

#### V.2.4 Desarrollo de las biopelículas

##### V.2.4.1 Crecimiento de biopelículas de *L. lactis* UQ2

Las placas de acero inoxidable y vidrio se inocularon con 100  $\mu$ L del cultivo centrifugado y se dispersaron en el área de tratamiento con un asa de platino estéril. Las placas inoculadas se lavaron cada 24 h con 10 mL de amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7; Baker) y se alimentaron con 100  $\mu$ L de caldo MRS. Las placas se colocaron en recipientes plásticos conteniendo agua estéril y se cerraron herméticamente para mantener una humedad relativa del 100%. Se almacenaron a 30°C.

##### V.2.4.2 Crecimiento de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A

Las placas de acero inoxidable y vidrio se inocularon con 100  $\mu$ L del cultivo centrifugado y se dispersaron en el área de tratamiento con un asa de platino estéril. Las placas inoculadas se lavaron cada 24 h con 10 mL de amortiguador de fosfatos (50mM, pH 7; Baker) y se alimentaron con 200  $\mu$ L de CST. Las placas se colocaron en recipientes plásticos conteniendo agua estéril y se cerraron herméticamente para mantener una humedad relativa del 100%. Se almacenaron a 37°C.

#### V.2.5 Cinética de crecimiento de las biopelículas

El desarrollo de las biopelículas de *L. lactis* UQ2 y de *L. monocytogenes* Scott A sobre vidrio y acero inoxidable se llevó a cabo por 5 días. Cada día se hizo el recuento de las células formadoras de la biopelícula y se observaron en un microscopio de epifluorescencia, trabajando con luz blanca (Zeiss Axioskope 40).

#### V.2.6 Tinción con cristal violeta y observación en el microscopio

Las biopelículas de *L. lactis* UQ2 al quinto día de su formación sobre una superficie de vidrio fueron inundadas con cristal violeta [2 g cristal violeta, 20 mL etanol, 0.8 g oxalato de amonio (Sigma), 80mL agua destilada] hasta cubrir el área del

portaobjetos marcada, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 min y posteriormente se enjuagaron con agua destilada hasta quitar el exceso de colorante. Los portaobjetos teñidos se observaron en el microscopio con luz blanca.

#### V.2.7 Microscopía de hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Las células formadoras de las biopelículas de *L. lactis* UQ2 y de *L. monocytogenes* Scott A sobre vidrio y acero inoxidable se fijaron con formamida al 3.7 % (v/v) en amortiguador de fosfatos pH 7.2 (PBS) por 12 h a 4°C y se lavaron dos veces con PBS. Se almacenaron en solución de PBS/etanol (1:1 v/v) por 1 h a -20°C. Las células se deshidrataron por inmersión durante 3 min en soluciones de etanol al 50% (v/v), 80% (v/v), 95% (v/v), respectivamente y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las placas se incubaron por 30 min a 46°C en condiciones isotónicas.

Se utilizaron dos sondas: Lis-637, marcada con fluoresceína (5'-CAC TCC AGT CTT CCA GTT TCC- 3'), y Strc493, marcada con Cy3 (5'-GTT AGC CGT CCC TTT CGT G -3') (Sigma Genosys). Se prepararon dos soluciones, cada una con 8 µL del amortiguador de hibridación: 100 mM de Tris pH 7, 0.9% w/v NaCl y 0.1% p/v de SDS; y se le añadió 1µ de la sonda (50 ng/µL). La mezcla se colocó sobre la biopelícula y se incubó por 2 h a 46°C. Posteriormente las biopelículas se enjuagaron con 5 mL de la solución de lavado (1 mL de Tris pH 8 y 7.75 mL de NaCl 4 M aforado a 50 mL con agua destilada) la cual se precalentó a 46°C y posteriormente las placas se sumergieron en esa solución por 20 min. Las biopelículas se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en la oscuridad hasta su observación en el microscopio electrónico de fluorescencia, a una longitud de onda de 495 a 520 nm y con un filtro azul (FITC) (García-Almendárez y col., 2008).

#### V.2.8 Tratamiento de biopelículas con agua electrolizada neutra

Las biopelículas de *L. lactis* UQ2 y de *L. monocytogenes* Scott A al quinto día de su formación, se sumergieron en 15 mL de AEN a diferentes tiempos y concentraciones. Para el tratamiento control las biopelículas se sumergieron en 15

mL de agua desionizada estéril.

Después del tratamiento, las placas se sumergieron en una solución amortiguador neutralizante (Difco) el cual contiene 0.0043% fosfato monopotásico, 0.016% tiosulfato de sodio y 0.5% de aril sulfonato durante 10 s para neutralizar el cloro residual del AEN. Las placas del tratamiento control fueron sumergidas directamente en la solución amortiguador neutralizante durante 10 s.

#### V.2.9 Recuperación de células formadoras de la biopelícula

El recuento de las células se realizó por el método de la gota (Miles Misra), el cual consiste en dividir la caja petri en 3 sectores, agregando en cada sector 20  $\mu$ L de cada una de 3 diluciones diferentes por triplicado. Las células se recuperaron por frotación con un hisopo húmedo estéril que se introdujo en un tubo con 10 mL de solución salina 0.85% NaCl, se homogenizó en vortex (Daigger) y se hicieron diluciones seriadas (1:10). En una caja petri con agar MRS (Oxoid) para *L. lactis* UQ2 y agar Oxford (Oxoid) para *L. monocytogenes* Scott A. Las cajas se incubaron por 24 h a 30°C para *L. lactis* UQ2 y por 24 h a 37°C para *L. monocytogenes* Scott A y posteriormente se contaron en un cuenta colonias (Leica).

#### V.2.10 Tratamiento de células libres con agua electrolizada neutra

Un volumen de 9 mL de AEN a una concentración determinada (tratamiento) agua desionizada (control) se transfirieron por separado en tubos con tapa estériles. Los tubos fueron colocados a la temperatura de tratamiento para temperarlos. Cada tubo contenía 9mL de AEN o desionizada y se le agregó 1mL del inóculo de *L. lactis* UQ2 o de *L. monocytogenes* Scott A, posteriormente se incubaron a 4°C por 0.5, 1, 1.5 y 2 min y a 30°C por 0.5, 1, 1.5 y 2 min.

#### V.2.11 Recuperación de células libres viables

Después del tiempo de incubación, las células viables de cada tratamiento fueron determinadas por conteo en placa. Se hicieron diluciones seriadas (1:10) en solución salina 0.85% NaCl y posteriormente se sembraron por la técnica de Miles



Misra en cajas petri con agar MRS para *L. lactis* UQ2 y agar Oxford para *L. monocytogenes* Scott A. Las cajas se incubaron por 24 h a 30°C para *L. lactis* UQ2 y por 24 h a 37°C para *L. monocytogenes* Scott A y posteriormente se contaron en el cuenta colonias.

#### V.2.12 Análisis de datos

Los tratamientos se realizaron por duplicado y se calculó el promedio de cada determinación para evaluar el efecto del tiempo de contacto de AEN sobre la población de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Cinética de crecimiento de biopelículas de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A

La cinética de crecimiento de las células de *L. lactis* UQ2 en forma de biopelícula, se llevó a cabo durante cinco días, en los cuales se monitoreó el desarrollo de éstas sobre dos materiales (Figura 5). Las superficies de vidrio se preconditionaron con una solución de L-lisina 0.1 mM y las de acero inoxidable con una solución de leche 0.02%. Se puede observar que en el día cero (día de la inoculación) se tiene un inóculo cercano a los 10 logaritmos, y después de un día se reduce la población hasta 7 logaritmos, lo que indica que no todas las células se adhieren a la superficie. El crecimiento de *L. lactis* UQ2 no sigue la misma tendencia sobre ambos materiales; el desarrollo de la biopelícula sobre vidrio se obtuvo al quinto día de su formación, con una población de 8.06 log, mientras que sobre acero inoxidable su máxima población se encontró a los 4 días de formación con 8.13 log y para el quinto día se redujo la población a 7.3 log. Al realizar una prueba estadística de medianas (utilizando el software JMP), se observa que existe una diferencia significativa en la población al quinto día de formación sobre ambos materiales, sin embargo, se tienen que hacer más experimentos para comprobarlo mediante el uso de otras herramientas estadísticas.

La cinética de crecimiento de las células de *L. monocytogenes* Scott A en forma de biopelícula, se llevó a cabo durante cinco días (Figura 6). Las superficies de vidrio se preconditionaron con una solución de L-lisina 0.1 mM y las de acero inoxidable con una solución de leche 0.02%. Se puede observar que en el día cero (día de la inoculación) se tiene un inóculo cercano a los 10 logaritmos, y después de un día se reduce la población hasta 7 logaritmos, lo que indica que no todas las células se adhieren a la superficie. Esta cinética sigue la misma tendencia en vidrio que en acero inoxidable. La mayor población se encuentra a los 4 días de formación con 8.3 y 8.1 log, mientras que a los 5 días de formación se observa una reducción de 0.77 y 0.57 log respectivamente.

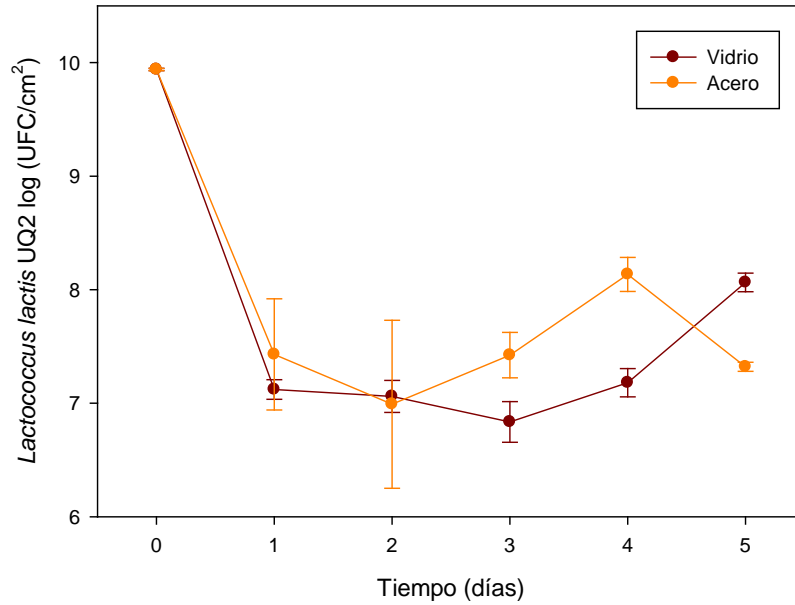


Figura 5. Cinética de crecimiento de biopelículas de *L. lactis* UQ2 sobre vidrio y acero inoxidable.

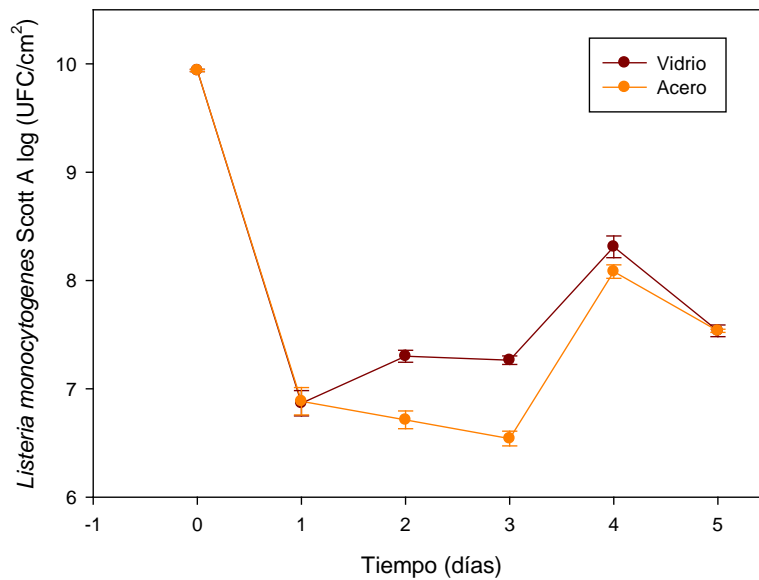


Figura 6. Cinética de crecimiento de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A sobre vidrio y acero inoxidable.

## VI.2. Tratamiento de células libres con agua electrolizada neutra

El recuento de células libres viables de *L. lactis* UQ2 posteriores a la exposición con AEN se observan en la Figura 7, donde el tratamiento se llevó a cabo con una concentración de 100 y 500 ppm (recomendación del fabricante) por 0.5, 1.5, 2, 4, 6 y 15 min de exposición; en esta gráfica se observa una reducción de 6.3 log para ambas concentraciones en todos los tiempos de contacto, esto es, hasta el límite de detección, el cual tiene un valor de 1.7 log debido a la técnica microbiológica utilizada (Miles Misra). Los controles de todos los tratamientos muestran una población alrededor de 8 log.

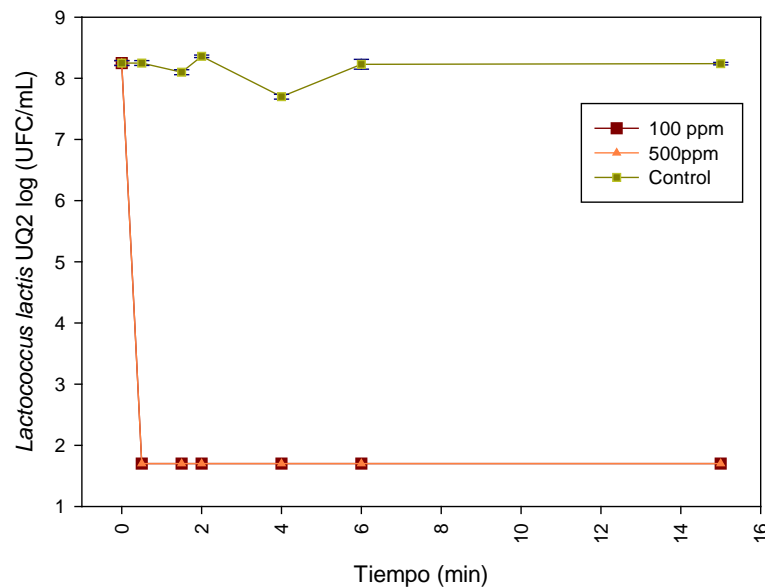


Figura 7. Inactivación de células libres de *L. lactis* UQ2 por la exposición a 100 y 500 ppm de AEN por 0.5, 1.5, 2, 4, 6 y 15 min.

Otro tratamiento de células libres de *L. lactis* UQ2 con AEN se observa en la Figura 8, donde las condiciones del tratamiento fueron 5, 15, 30 y 50 ppm por 0.5 y 1.5 min de exposición. En dicha gráfica se muestra que una concentración de 50 ppm por 5 min es efectiva para la inactivación de *L. lactis* UQ2, mientras que la concentración más baja no tuvo algún efecto inhibitorio (8 log).

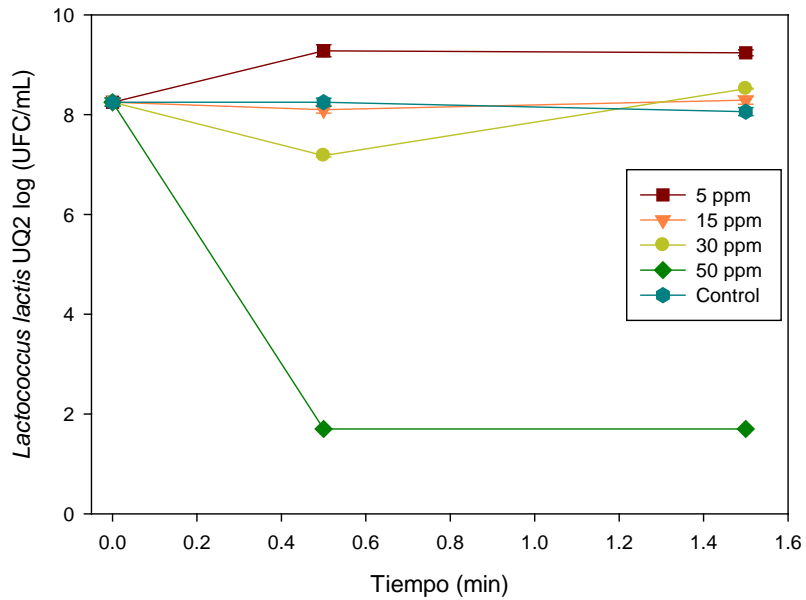


Figura 8. Inactivación de células libres de *L. lactis* UQ2 por la exposición a 5, 15, 30 y 50 ppm de AEN por 0.5 y 1.5 min.

El recuento de células libres viables de *L. monocytogenes* Scott A posteriores a la exposición con AEN se observa en la Figura 9, donde las condiciones para el tratamiento fueron 30, 50 y 500 ppm (recomendado por el fabricante) por 1, 5 y 10 min de exposición. En esta gráfica se observa que una concentración de 30 ppm por 1 min produce una reducción en la población de 7 log, esto es, hasta el límite de detección. Los controles para los tres tiempos de exposición tienen una población alrededor de 8 log.

Las condiciones para el tratamiento de células libres de *L. monocytogenes* Scott A fueron 5, 10 y 20 ppm de AEN por 1, 4 y 8 min de exposición. En la Figura 10, se observa el recuento de las células viables posteriores al tratamiento, donde los controles para ambos tratamientos tienen una población de 8.5 log. El efecto bactericida sobre las células libres de *L. monocytogenes* Scott A se observa a una concentración de 10 ppm durante un tiempo de exposición a 8 min o a 20 ppm por un tiempo de 4 min.

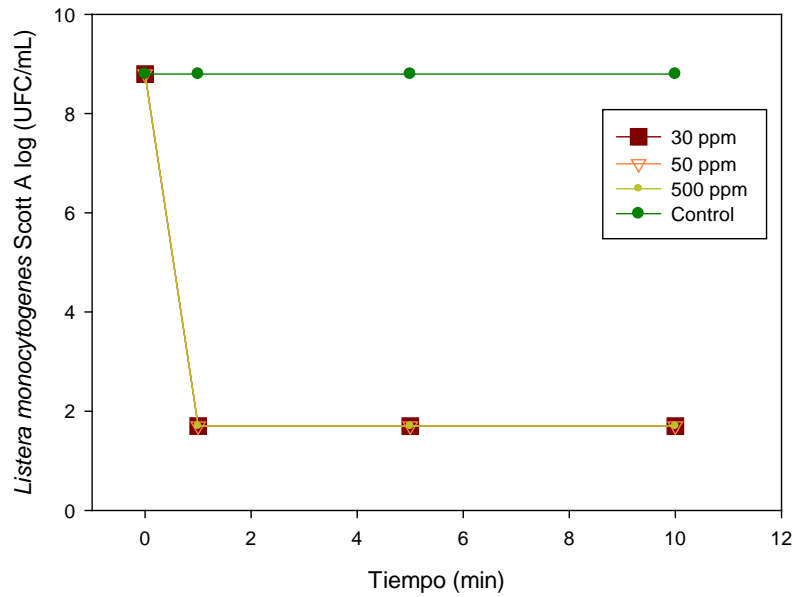


Figura 9. Inactivación de células libres de *L. monocytogenes* Scott A por la exposición a 30, 50 y 500 ppm de AEN por 1, 5 y 10 min.

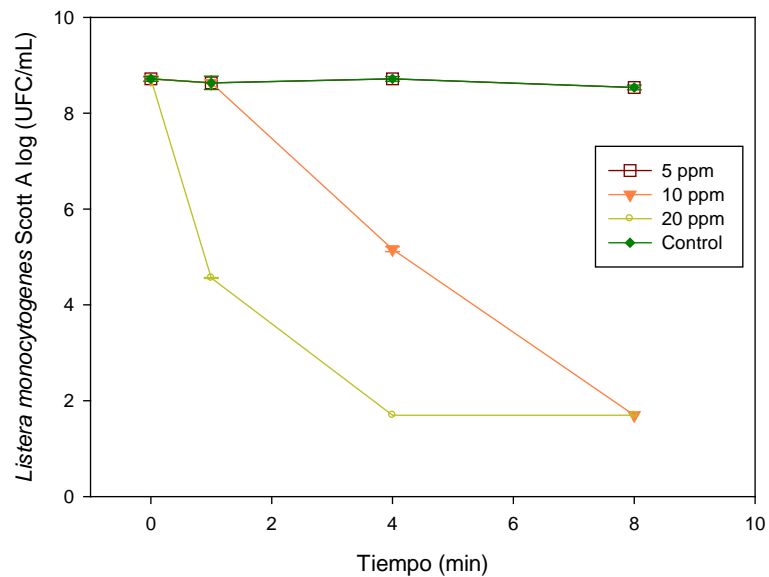


Figura 10. Inactivación de células libres de *L. monocytogenes* Scott A por la exposición a 5, 10 y 20 ppm de AEN por 1, 4 y 8 min.

Se trataron células libres de *L. lactis* UQ2 a una concentración de 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 min a una temperatura de 4°C, donde el recuento de las células viables se observa en la Figura 11. La población para el control en todos los tiempos fue de 8 log. Cuando se exponen las células a una concentración de 25 ppm por un tiempo de exposición de 0.5 min, se observa una reducción hasta el límite de detección y cuando se utiliza una concentración de 15 ppm por 0.5 min la población se reduce a 2 ciclos log, pero conforme pasa el tiempo se observa un incremento en la población hasta llegar alrededor de 4 log en 2 min. Utilizando una concentración de 20 ppm, se observa que al igual que utilizando la concentración de 15 ppm, las células de *L. Lactis* UQ2, muestran en el tiempo de exposición más corto, 0.5 min, un reducción hasta el límite de detección, pero conforme pasa el tiempo, la población aumenta hasta llegar alrededor de 3 logaritmos, con lo cual se puede observar que a bajas concentraciones, esto es 15 y 20 ppm, el AEN muestra un efecto bacteriostático, mientras que a mayores concentraciones, 25 y 30 ppm, el AEN muestra un efecto bactericida contra las células de *L. Lactis* UQ2.

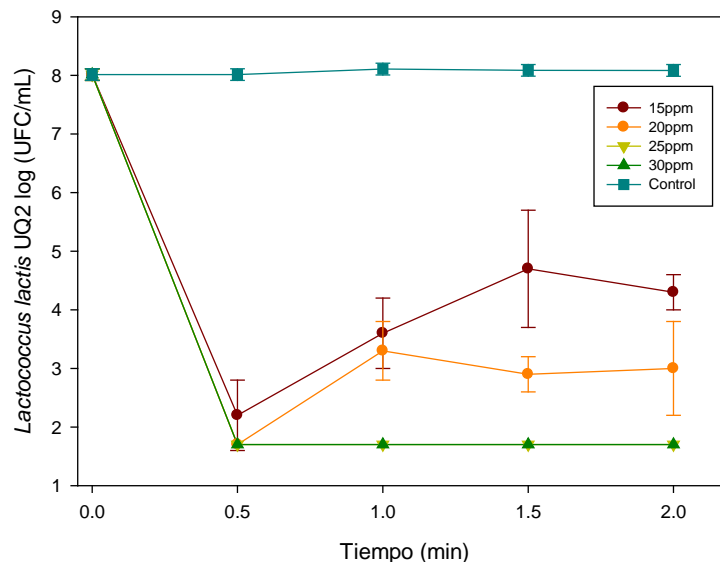


Figura 11. Inactivación de células libres de *L. lactis* UQ2 por la exposición a 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 min a 30°C.

La concentración mínima bactericida (CBM) o concentración letal mínima (CLM) se define como la concentración mínima necesaria del antimicrobiano que produce una reducción de la población del 99.9% ( $1 \times 10^3$ ) del inóculo inicial. La CBM para el AEN sobre células libres de *L. lactis* UQ2 (Figura 12) se observa que a una concentración de 15 y 20 ppm, no hay una reducción hasta el límite de detección, esto es, a estas concentraciones se pueden recuperar células viables, mientras que a una concentración de 25 ppm se llega a una reducción hasta el límite de detección, y es por esto que la CMB es 25 ppm.

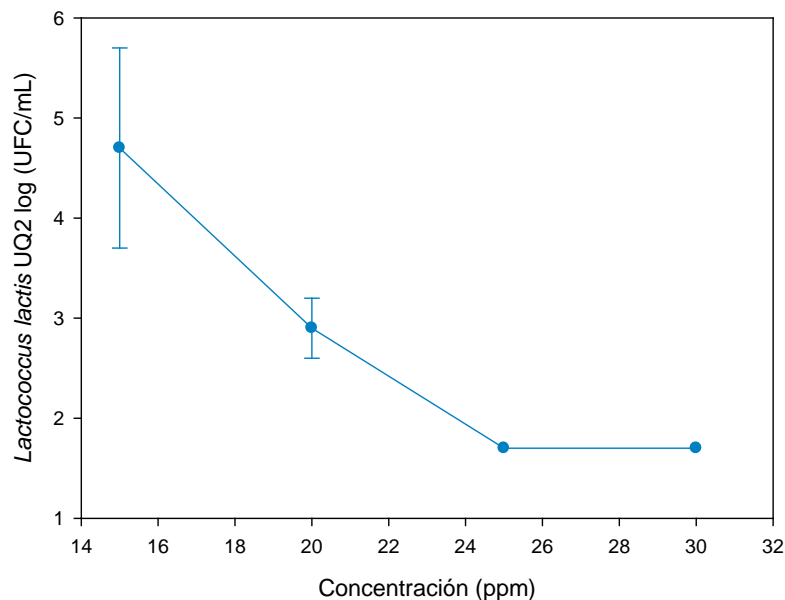


Figura 12. Concentración mínima bactericida (CMB) de AEN para *L. lactis* UQ2

Se trataron células de *L. monocytogenes* Scott A a una concentración de 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 min a una temperatura de 30°C y 4°C, Figuras 13 y 14 respectivamente. En la Figura 13, se puede observar el efecto totalmente inhibitorio del AEN sobre células libres de *L. monocytogenes* Scott A a 20 ó 25 ppm por un tiempo de exposición de 0.5 min o bien a 15 ppm por un tiempo de 1.5 min.

En la Figura 14 se observa que el efecto inhibitorio hasta el límite de detección se



logró con una concentración de AEN 30 ppm por un tiempo de contacto de 0.5 min. Para las concentraciones menores, no se observa un comportamiento estable ni una inhibición hasta el límite de detección en la población, esto nos indica que el AEN a bajas concentraciones, esto es 15, 20 y 25 ppm, muestra un efecto bacteriostático en las células libre de *L. monocytogenes* Scott A. El tratamiento control tuvo una población de alrededor de 9 log.

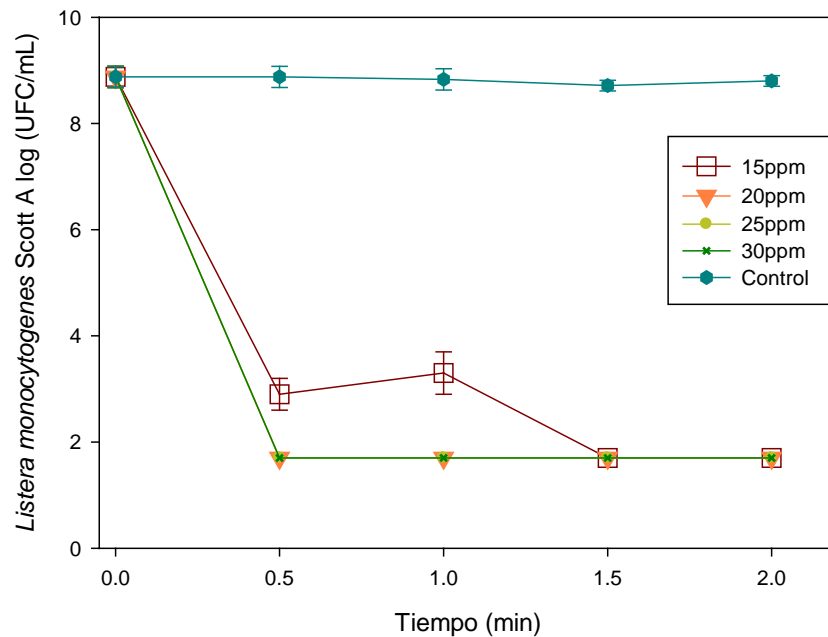


Figura 13. Inactivación de células libres de *L. monocytogenes* Scott A por la exposición a 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 min a 30°C.

La CBM o CML para el AEN sobre células libres de *L. monocytogenes* Scott A se muestra en la Figura 15. En esta gráfica se observa que a una concentración de 15 ppm, no hay un efecto inhibitorio, ya que, a estas concentraciones se pueden recuperar células viables, mientras que a una concentración de 20 y 25 ppm se observa una reducción de la población alrededor de 4 logaritmos, pero es hasta una concentración de 30 ppm, cuando se observa una reducción hasta el límite de detección, es por esto la CMB es 30 ppm.

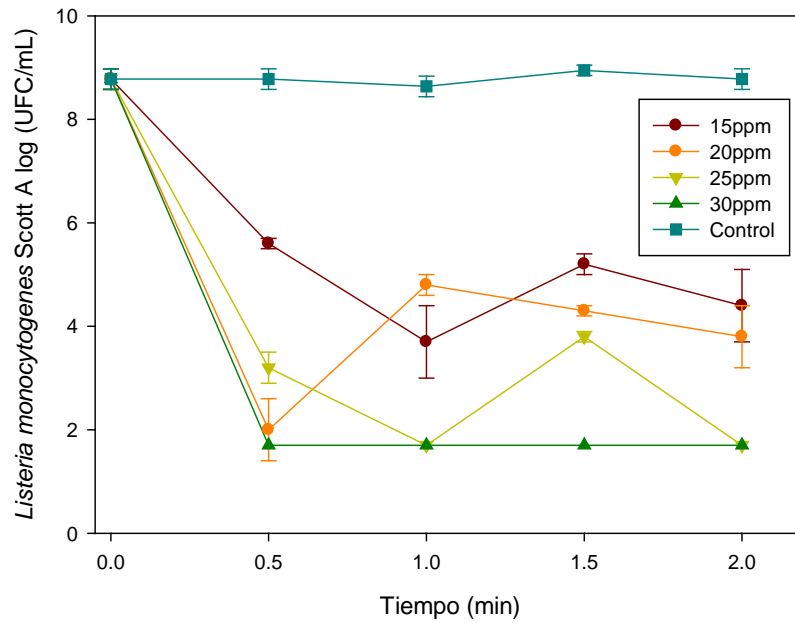


Figura 14. Inactivación de células libres de *L. monocytogenes* Scott A por la exposición a 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 min a 4°C.

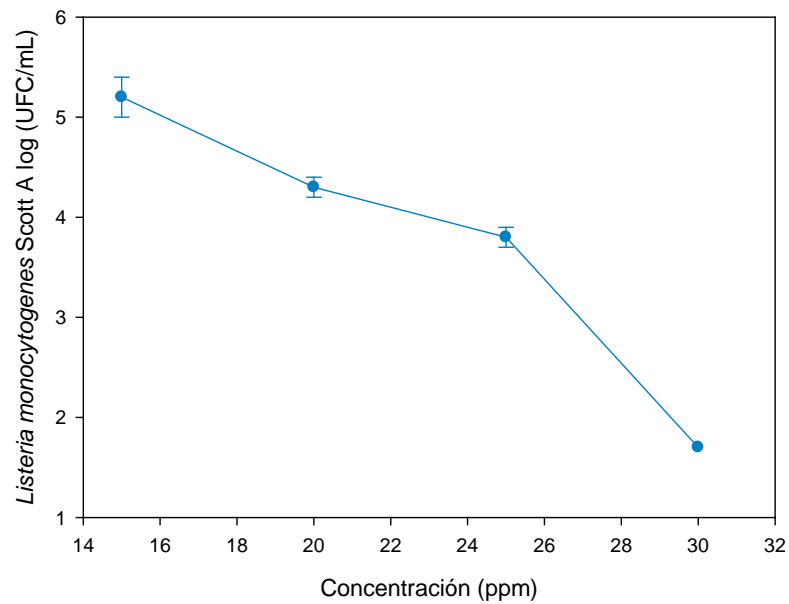


Figura 15. Concentración mínima bactericida (CMB) de AEN para *L. monocytogenes* Scott A

### VI.3 Tratamiento de biopelículas con agua electrolizada neutra

McEldowney y Fletcher (1987) realizaron un estudio que demuestran que la presencia de una capa de materia orgánica en una superficie puede promover la adhesión de las células bacterianas y para comprobarlo en el presente estudio se crecieron biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A sobre vidrio y acero inoxidable, los cuales estaban precondicionados con una solución de L-lisina 0.01mM y una solución de leche 0.02%, mientras que los controles no fueron precondicionados. Se observa (Figura 16) que la menor población corresponde al vidrio sin precondicionar con 5.46 log y la mayor población corresponde al vidrio precondicionado con leche 0.02%. Al realizar una prueba de Tukey de comparaciones de medias (utilizando el software JMP) se observó que no existe una diferencia significativa sobre los tratamientos realizados salvo el tratamiento con vidrio que no fue precondicionado.

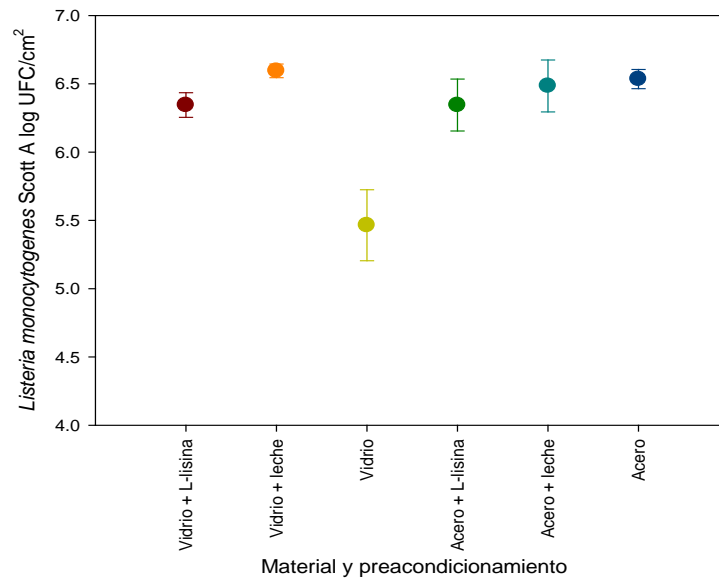


Figura 16. Preacondicionamientos para la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A sobre vidrio y acero inoxidable.

El recuento de células viables formadoras de biopelículas de *L. lactis* UQ2 sobre vidrio y acero inoxidable posteriores a la exposición con AEN se observa en la

Figura 17, donde se muestra un mayor efecto inhibitorio sobre las células formadoras de la biopelícula crecidas sobre una superficie de acero inoxidable que crecidas sobre una superficie de vidrio, ya que la reducción hasta el límite de detección (1.7 logaritmos) para acero inoxidable se observó en un tiempo de contacto de 1 min, mientras que sobre vidrio la reducción hasta el límite de detección se muestra a un tiempo de contacto de 45 min. Se observa también que existe una mayor población sobre vidrio que sobre acero inoxidable, donde el promedio es de 7.95 y 6.47 log respectivamente; con lo cual se puede considerar que la reducción de *L. lactis* UQ2 fue más rápida sobre acero inoxidable que sobre vidrio debido a la menor población adherida en acero inoxidable.

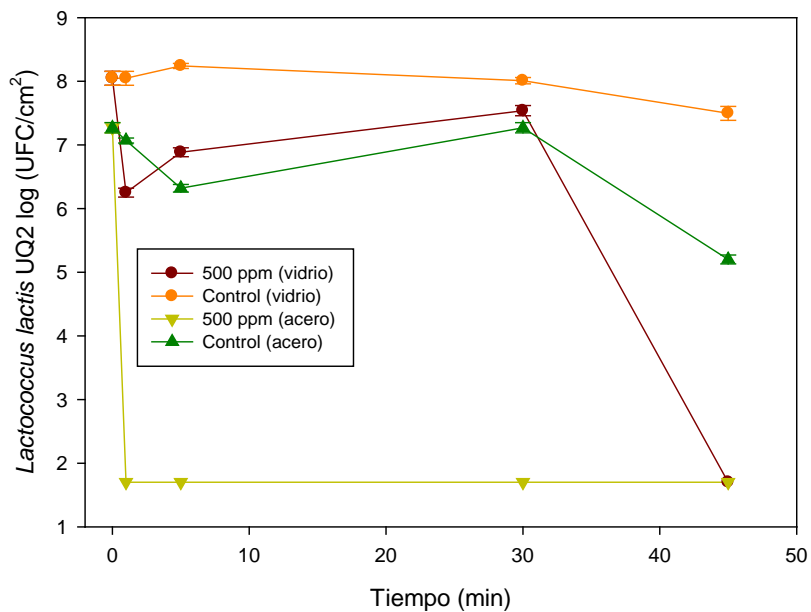


Figura 17. Inactivación de células de *L. lactis* UQ2 formadoras de biopelículas sobre vidrio y acero inoxidable por la exposición a 500 ppm de AEN por 1, 5, 30 y 45 min.

La población sobreviviente de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A sobre acero inoxidable posterior a la exposición con AEN a una concentración de 50, 100, 250 y 500 ppm por un tiempo de 10 min se observa en la Figura 18. Aquí se muestra que la exposición a una concentración de 50 ppm no es suficiente para

inactivar las células de *L. monocytogenes* Scott A, ya que se observa el mismo crecimiento que el tratamiento control con una población de 6.4 log, mientras que a una concentración de 100 ppm por 10 min se observa una reducción de 4.7 log, esto es, una reducción hasta el límite de detección.

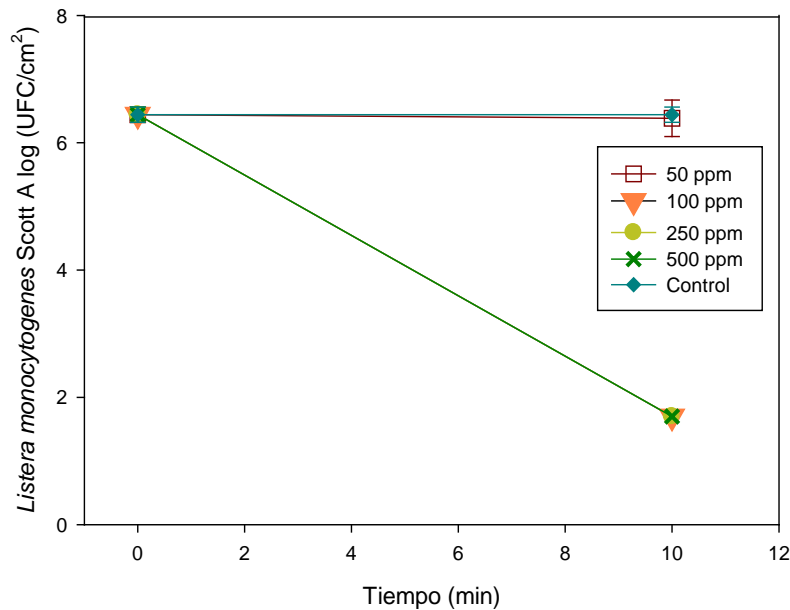


Figura 18. Inactivación de células de *L. monocytogenes* Scott A formadoras de biopelículas sobre acero inoxidable por la exposición a 50, 100, 250 y 500 ppm de AEN por 10 min.

La población sobreviviente de células formadoras de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A sobre vidrio y acero inoxidable, luego de exponerse al AEN a concentraciones de 60 y 65 ppm por 10 y 15 min, se muestra en la Figuras 19 y 20 respectivamente. En la Figura 19 se observa que el tratamiento control tiene ligeras fluctuaciones no significativas entre 6.3 y 6.7 log UFC/cm<sup>2</sup>. A 60 ppm de AEN se observa una reducción de alrededor de 1.3 log para ambos tiempos, donde también se observa un efecto bacteriostático, mientras que a una concentración de 65 ppm la reducción hasta el límite de detección se observa a los 10 min de exposición o probablemente ocurrió antes, pero no se sabe con exactitud ya que no se efectuaron determinaciones en tiempos menores de exposición.

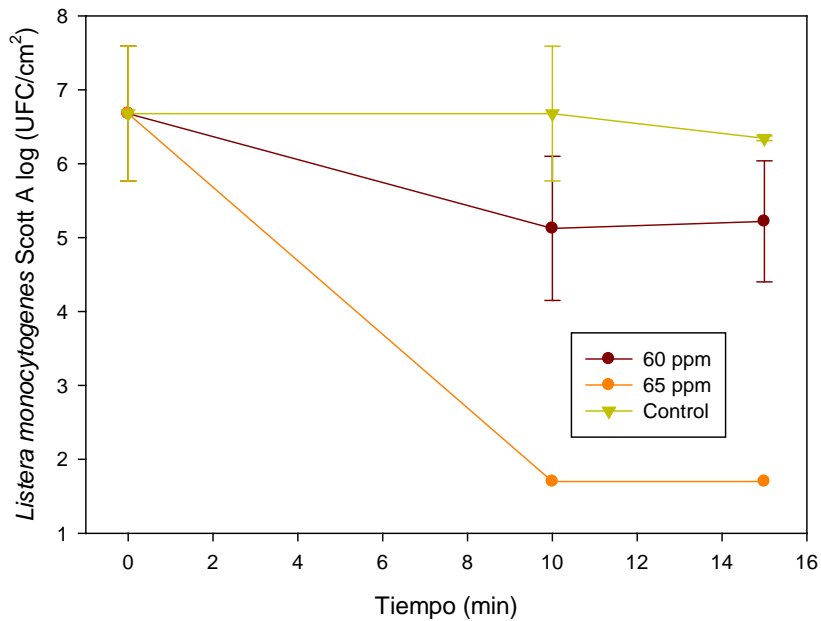


Figura 19. Inactivación de células de *L. monocytogenes* Scott A formadoras de biopelículas sobre vidrio por la exposición a 60 y 65 ppm de AEN por 10 min.

En la Figura 20 se muestra que el tratamiento control tiene una población que fluctúa de manera no significativa entre 6.4 y 6.8 log UFC/cm<sup>2</sup>, y con respecto a los controles sobre vidrio tampoco existe diferencia significativa en la población. Al poner en contacto las biopelículas a 60 ppm de AEN por 10 min, se observa una reducción en la población de 3 log, mientras que por 15 min se observa una reducción hasta el límite de detección (1.7 log por la técnica utilizada). Por otro lado, a 65 ppm de AEN se logró una reducción hasta el límite de detección al tener un tiempo de contacto de 10 min; debido a que no se efectuaron mediciones de la población sobreviviente en las biopelículas, es probablemente que la reducción hasta el límite de ocurriera en un tiempo menor a 10 min, es por esto que se tienen que hacer más estudios para detectar si lo mencionado anteriormente ocurre en menores tiempos de exposición.

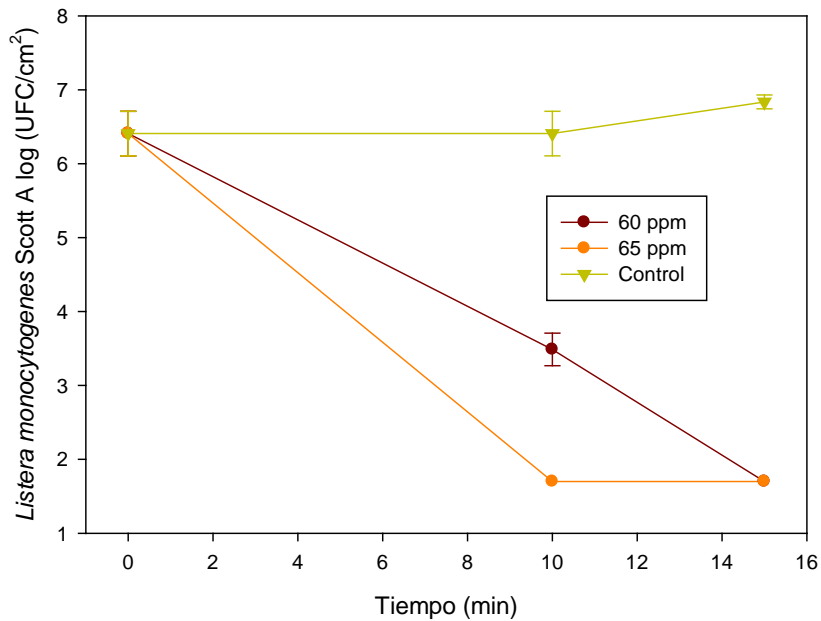


Figura 20. Inactivación de células de *L. monocytogenes* Scott A formadoras de biopelículas sobre acero inoxidable por la exposición a 60 y 65 ppm de AEN por 10 min.

#### VI.4 Tinción con cristal violeta

La tinción con cristal violeta de biopelículas de *L. lactis* UQ2 muestra de manera gráfica el proceso de formación de la biopelícula en un periodo de 5 días (Figura 21).

En la primera etapa de formación de la biopelícula, las células libres o planctónicas se adhieren a la superficie de la placa de vidrio (Figura 21a). Las células adheridas comienzan a crecer y forman el SPE, según se muestra en la Figura 21b. La tercera etapa de formación de la biopelícula involucra la formación de la microcolonia por las células adheridas, debido a que se encuentran protegidas por las SPE (Figura 21c y 21d); finalmente, la Figura 21e muestra la microcolonia madura, esto es, la última etapa de formación de la biopelícula.

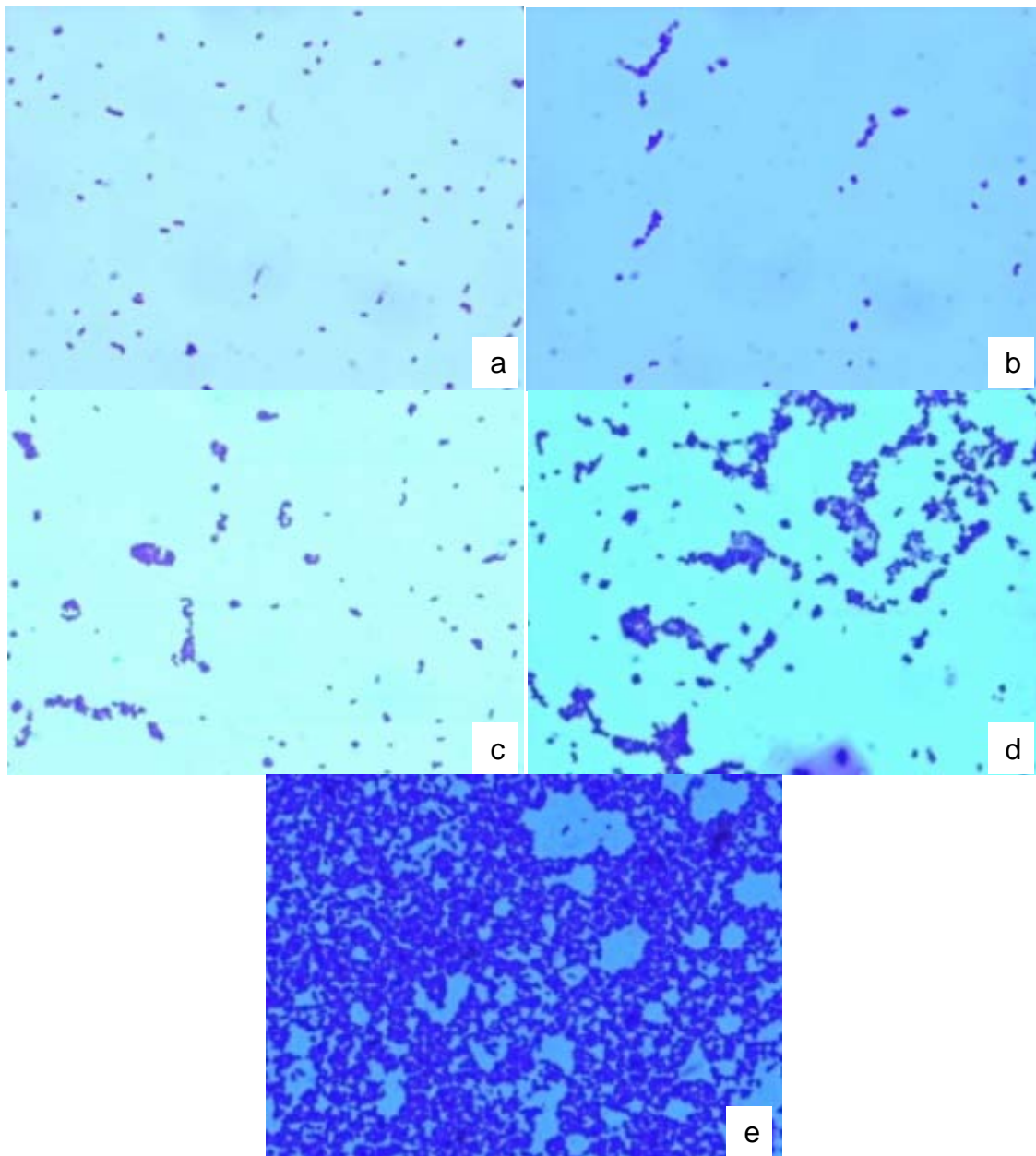


Figura 21. Tinción con cristal violeta de biopelículas de *L. lactis* UQ2. Proceso de formación de la biopelícula en un periodo de 5 días. a) Día 1, b) día 2, c) día 3, d) día 4, e) día 5. Imagen observada con objetivo 1000x.

#### VI.5 Microscopía de hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Para la hibridación de las biopelículas sobre ambos materiales, vidrio y acero inoxidable, se utilizó la sonda Strc493 para *L. lactis* UQ2, y para las biopelículas de



*L. monocytogenes* Scott A la sonda Lis637. Las sondas utilizadas tienen especificidad por el gen que codifica para la subunidad 16S rRNA de las biopelículas de *L. Lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A (Figuras 22 y 23, respectivamente).

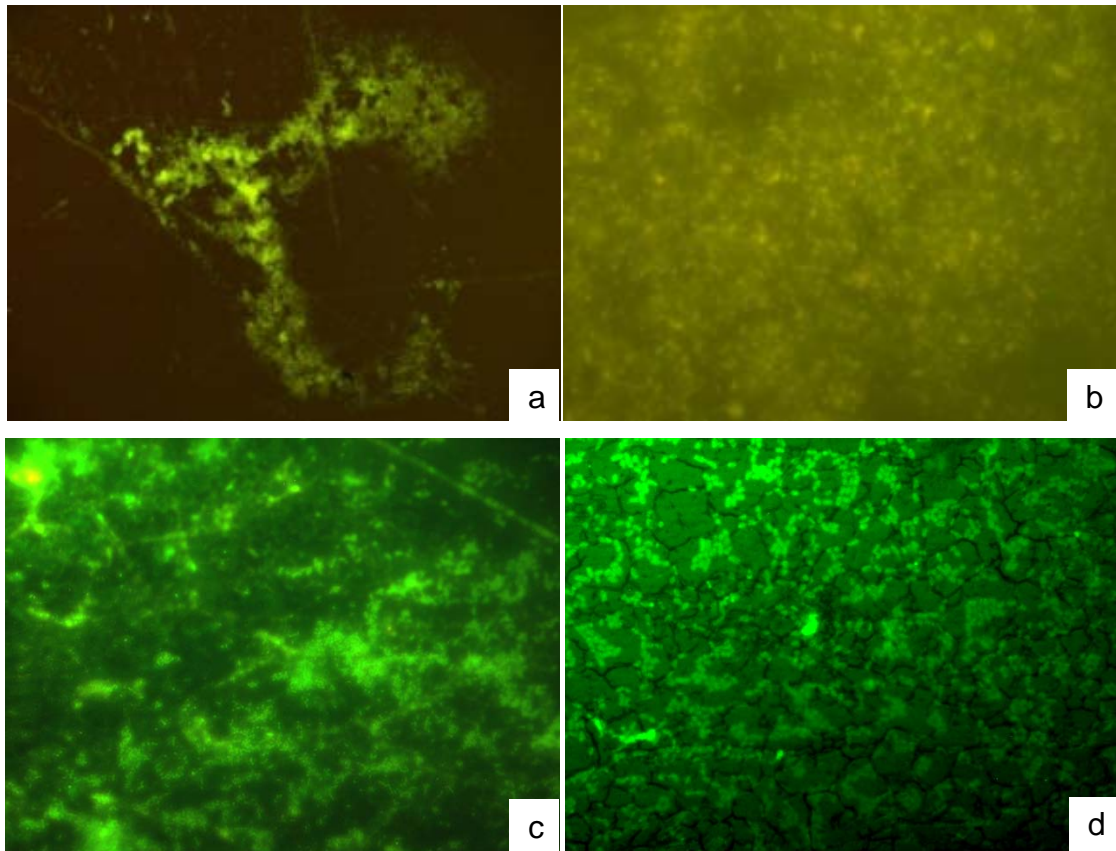


Figura 22. Hibridación fluorescente *in situ* de biopelículas de *L. lactis* UQ2 con sonda Strc493 al quinto día de su formación; a y b en superficie de vidrio, c y d en superficie de acero inoxidable. Imagen observada con objetivo 1000x.

Las biopelículas de *L. lactis* UQ2 al quinto día de su formación en vidrio e hidridizadas por la técnica FISH, se pueden observar en las Figuras 22a y 22b, mientras que aquellas formadas en acero inoxidable se muestran en las Figuras 22c y 22d. Los puntos brillantes que se observan en la Figura 22a, son las células bacterianas formadoras de la biopelícula y los materiales que se distinguen

alrededor de las células son los SPE formados por los mismos microorganismos de la biopelícula. La Figura 22b, muestra un agregado de células bacterianas que forman parte de la biopelícula, adheridas a la placa de vidrio. En la Figura 22c y 22d, se muestran las células formadoras de la biopelícula, esto es, los puntos brillantes, los cuales se encuentran rodeados de sustancias poliméricas extracelulares. Se observa que el crecimiento de *L. lactis* UQ2 sobre vidrio es homogéneo (Figura 22a), mientras que el crecimiento sobre el acero inoxidable es en forma de agregados, donde hay partes de la superficie que no muestran crecimiento (Figura 22d).

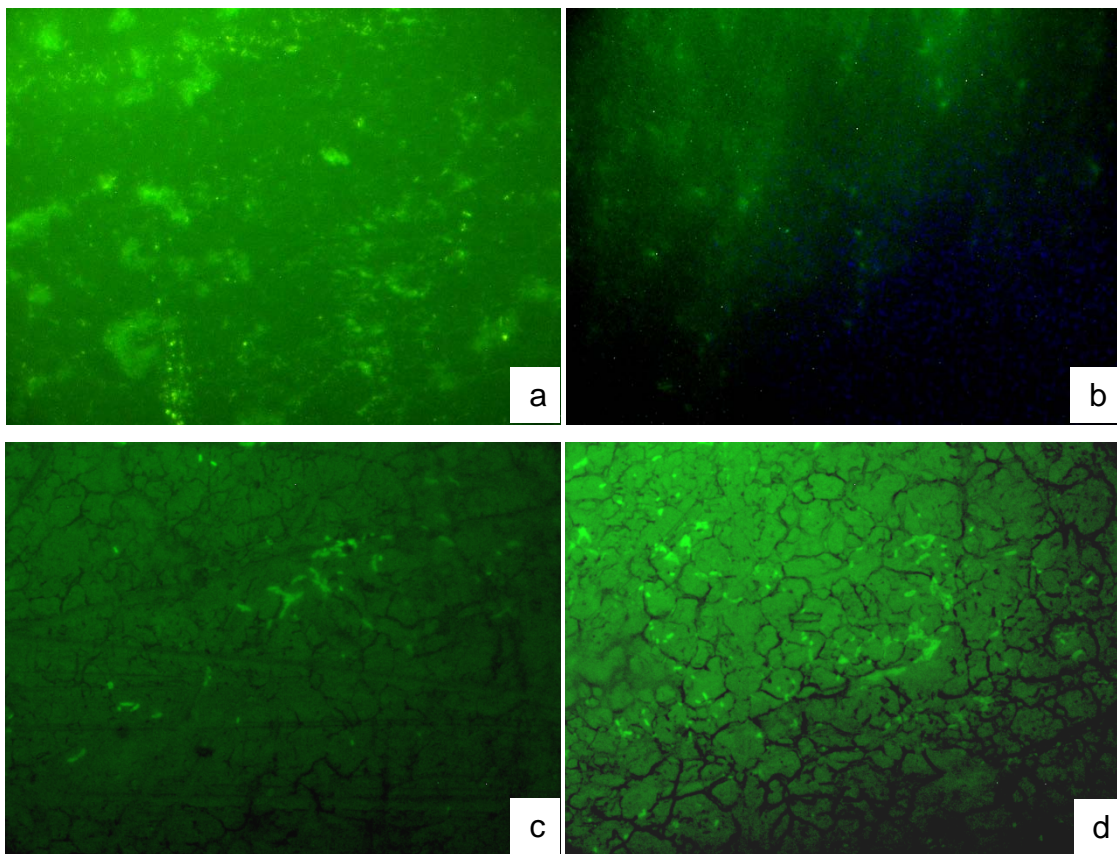


Figura 23. Hibradación fluorescente *in situ* de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A con sonda Lis637 al quinto día de su formación; a y b en superficie de vidrio, c y d en superficie de acero inoxidable. Imagen observada con objetivo 1000x.

Las biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A al quinto día de formación e hibridizadas por la técnica FISH se pueden observar en la Figura 23, las cuales se crecieron sobre vidrio (Figura 23a y 23b) y sobre acero inoxidable (Figura 23c y 23d). En todas las figuras se puede observar que los puntos brillantes son las células bacterianas formadoras de las biopelículas, las cuales tienen forma de bacilos. En las Figuras 23a y 23b, se puede observar una mayor población de bacterias (puntos brillantes) y se distinguen las SPE (materiales que rodean las células). En las Figuras 23c y 23d, se pueden observar las estrías que presenta la superficie del acero inoxidable y el crecimiento de las células sobre dichas estrías.

La comparación de las biopelículas de *L. lactis* UQ2 y de *L. monocytogenes* Scott A (Figuras 22 y 23), muestra que existe una mayor población bacteriana en las biopelículas de *L. lactis* UQ2 para ambos materiales, mientras que para biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A se muestra una menor población. También se observa que las biopelículas de *L. lactis* UQ2 secretan una mayor cantidad de sustancias poliméricas extracelulares, lo cual puede hacerlas más resistentes contra los solventes utilizados en la técnica FISH.

## VII DISCUSIÓN

En la actualidad, existe una mayor preocupación por generar alimentos sanos y evitar la contaminación o recontaminación de éstos con microorganismos patógenos. Es por esto que la limpieza y sanitización son prácticas de higiene importantes en el ambiente del procesamiento de alimentos. Para tal fin se han usado una gran cantidad de sanitizantes y agentes antimicrobianos como el agua electrolizada, objeto de este estudio, dada su perspectiva de uso. El agua electrolizada ha ganado popularidad para su utilización en la industria de los alimentos porque reduce o elimina bacterias de diferentes productos alimenticios. Una prueba de lo anterior es que ha sido aprobada en Japón como aditivo alimenticio por el Ministerio de salud, trabajo y bienestar, mientras que en Estados Unidos de América se aprobó para su uso en superficies en contacto con alimentos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (Hricova y col., 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, la formación de biopelículas implica un riesgo en el ambiente del procesamiento de alimentos, debido a que éstas pueden contener microorganismos patógenos y que funcionan protegiéndolos contra la desecación, agentes antimicrobianos y sanitizantes. Por tanto las biopelículas, permiten una mayor resistencia de los microorganismos a este ambiente adverso que las células libres (Chmielewski y Frank, 2003). Es por esto que se evaluó la efectividad del AEN sobre células libres y biopelículas de *L. lactis* UQ2 y de *L. monocytogenes* Scott A.

La mayor población de *L. lactis* UQ2 creciendo sobre vidrio comparada al crecer sobre acero inoxidable durante la cinética de crecimiento a lo largo de cinco días (Figura 5), probablemente se debe a la muerte de las células formadoras de la biopelícula o bien a que la biopelícula se encontraba en distintas etapas de crecimiento. Sobre vidrio, al quinto día, el microorganismo se encontraba en etapa de madurez, mientras que sobre acero inoxidable quizás se encontraba en etapa de desprendimiento de células para colonizar nuevas superficies o bien quizás

ocurrió la muerte de las células. También se encontró diferencia en la población de *L. monocytogenes* Scott A, mostrando la misma tendencia sobre ambos materiales, donde la máxima población se alcanzó al cuarto día, en contraste con *L. lactis* UQ2 cuya máxima población se observó al quinto día sobre vidrio. Esto puede explicarse considerando que la biopelícula se encontraba en etapa de madurez cuando se observó la máxima población, en la cual las condiciones fueron favorables para el crecimiento y aglomeración de las células bacterianas y como consecuencia la biopelícula desarrolló una estructura organizada.

La reducción de la población de *L. monocytogenes* al quinto día, probablemente se debió al desprendimiento o muerte de las células formadoras de la biopelícula. El recuento de la población en el primer día para ambos microorganismos sobre los dos materiales, arroja un valor alrededor de 7 ciclos log, mientras que si se considera la población al tiempo cero como la proveniente del inóculo, ésta fue cercana a los 10 log (Figuras 5 y 6), indicando con esto que no todas las células pudieron adherirse a las superficies. Un estudio similar fue realizado por Yang y col. (2009), donde crecieron biopelículas de *L. monocytogenes* por 21 días en superficies de polietileno de alta densidad (PEAD) rugoso y liso. Para el PEAD rugoso la población inicial fue de 6.3 log, mientras que al séptimo día fue de 5.7 log. Por otro lado, para el PEAD liso la población inicial fue de 6.2 log y de 4.39 log para el día 7.

En ambas Figuras (5 y 6) se observa un mayor crecimiento para ambos microorganismos sobre vidrio que sobre acero inoxidable; esto se debe las superficies de ambos materiales son muy diferentes, ya que el acero inoxidable presenta en su estructura estrías donde pueden alojarse los microorganismos mientras que superficies de el vidrio es más lisa; y las estrías presentes en el acero inoxidable dificultan la recuperación total de las células formadoras de la biopelícula por el método de frotación, el cual consiste en recuperar las células formadoras de las biopelícula por la frotación con un hisopo humedecido en una solución salina 0.85% NaCl. Speranza y col., (2009), crecieron biopelículas de *L. monocytogenes*

sobre superficies de acero inoxidable en presencia de bacterias lácticas no iniciadoras; para la recuperación de las células formadoras de la biopelícula, las placas de acero inoxidable se colocaron en tubos estériles que contenían 20 mL de solución salina 0.9% NaCl y se sonicaron a 20 Hz por 3 min para desprender las células de la superficie. Otro método de recuperación de células formadoras de biopelículas es el reportado por Roshi y col., (2009), en el cual recuperan las células de *L. monocytogenes* de una superficie de acero inoxidable colocando las placas en tubos estériles que contenían 30 mL de amortiguador de fosfatos pH 7.2 y 3 g de perlas de vidrio; los tubos se colocaron en un agitador orbital a 400 rpm por 10 min. La elección del método de recuperación va a depender de la disponibilidad de material, la facilidad y el tiempo de aplicación de cada método.

Con el fin de determinar con mayor claridad la reducción de las poblaciones de los microorganismos en estudio, se usaron poblaciones iniciales cercanas a 10 log, con una recuperación promedio para ambos materiales y ambos microorganismos al primer día de aproximadamente 7 log. En el estudio con el PEAD la reducción de la población ya había ocurrido al día 7, aunque probablemente ocurrió antes, ya que no se efectuaron determinaciones intermedias. Probablemente la población se redujo de la misma manera que en el presente estudio, observándose en el quinto día, para *L. lactis* UQ2 sobre vidrio y para *L. monocytogenes* sobre ambos materiales.

En el tratamiento de células libres de *L. lactis* UQ2 (Figuras 7, 8 y 11) con AEN a una concentración de 500 ppm (recomendación del fabricante) se observó una reducción de la población hasta el límite de detección, por lo cual se buscó una menor concentración y menor tiempo de contacto a la cual no sobreviviera éste microorganismo. Se encontró que dichas condiciones se cumplen a 50 ppm por 0.5 min a temperatura ambiente de 25°C (reducción de aproximadamente 6 log, Figura 8), o 30 ppm por 0.5 min, a 30°C (reducción de 6.5 log, Figura 11). También se encontró que aplicando un tratamiento con 5 ppm de AEN, pero a tiempos de contacto de 0.5 y 1.5 min, no se detectaba ningún efecto bactericida. En la Figura

11, se observa claramente un efecto bacteriostático sobre las concentraciones de AEN más bajas, esto se debe a que las concentraciones aplicadas no son lo suficiente para destruir o inhibir las población bacteriana. Es muy importante conocer las dosis adecuadas de los antimicrobianos o sanitizantes utilizados en las industrias de alimentos, ya que si no se aplican a una concentración apropiada se puede generar un efecto bacteriostático sobre los microorganismos, lo cual no va a producir su eliminación y por tanto se puede facilitar una contaminación cruzada o incluso del producto terminado.

Ongeng y col (2006), realizaron un estudio similar para bacterias lácticas en el que evaluaron el efecto del AE para inactivar microorganismos deterioradores en el procesamiento de agua y vegetales mínimamente procesados. Estos autores encontraron que sobre bacterias ácido lácticas inoculadas en lechuga, se produce una reducción de 1.9 log (UFC/g) por un tiempo de 5 min de exposición con una concentración de cloro residual de 3.6 ppm. No pueden compararse los resultados obtenidos por Ongeng y col (2006) y los del presente estudio, porque no se realizaron a los mismos tiempos de contacto. Sin embargo es sabido que el AEN pierde efectividad en presencia de materia orgánica que estudios usando cultivos puros (Roshni y col., 2009).

La CMB o CML del AEN sobre células libres de *L. lactis* UQ2 (Figura 12) fue de 25 ppm, lo cual indica que esta concentración es la necesaria para lograr un efecto bactericida. Es importante conocer este valor en la industria de alimentos para conocer la resistencia de los microorganismos ante un agente antimicrobiano determinado, así como para evaluar la actividad de nuevos agentes antimicrobianos.

En el tratamiento de células libres de *L. monocytogenes* Scott A (Figuras 9, 10, 13 y 14) se aplicaron diferentes concentraciones de AEN, desde 500 ppm (recomendación del fabricante) hasta 5 ppm, y diferentes tiempos de contacto, para lograr la inactivación en la menor concentración de AEN y el menor tiempo de

contacto. Estas condiciones se observan a una concentración de 20 ppm por 0.5 min o 15 ppm por 1.5 min a una temperatura 30°C con una reducción de 6.8 log. Park y col (2001) evaluaron la eficacia del agua electrolizada ácida y agua clorada acidificada contra *Escherichia coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en lechuga. Después de la inoculación, cada hoja fue sumergida en 1.5 L de AE por 1 a 3 min a 22°C, observando que la población de *L. monocytogenes* se reduce 2.65 log (UFC/hoja) por una exposición de 3 min.

Hricova y col. (2008) estudiando la desinfección de lechuga a 30°C, encontraron que concentraciones de 22-198 ppm de AEN por 5 min, lograban una reducción de 4 log (UFC/g). Tanto en el estudio previo como en este, se observa una reducción relativamente baja en la población, lo cual probablemente se debe a que tanto el AE ácida como la neutra pierden efectividad en presencia de materia orgánica.

En un estudio realizado sobre células libres, Venkitanarayanan y col. (1999), evaluaron la eficacia del AE en la eliminación de diversos microorganismos en suspensión, entre los que se encontraba *L. monocytogenes*. Estos autores observaron que en 5 min de exposición a 4°C hubo una reducción de 6.5 log de células de *L. monocytogenes*, mientras que se obtuvo inhibición total a tiempos de contacto de 10 y 15 min a la misma temperatura. El mismo efecto se observó a 23°C, ya que a tiempo de contacto de a 2 min a 35°, no se encontraron células viables y en 1 min a 45°C había una población < 1 log. El agua electrolizada usada en este estudio tenía un pH de 2.48-2.63, un potencial de óxido-reducción de 1158-1160 mV y una concentración de cloro libre de 43 ppm para 4°C, 48.5 ppm para 23°C, 79.8 ppm para 35°C y 73.3 ppm para 45°C.

En el presente estudio se obtuvieron valores similares de reducción, ya que al exponer las células de *L. monocytogenes* a una concentración de 30 ppm de AEN por 1 min, se encontró una reducción alrededor de 6.8 log, aunque comparando ambos experimentos, se observa que se obtiene la misma reducción de la población con una concentración similar de AE. Sin embargo, los tiempos de



contacto en los que se tuvo inhibición total son menores en el presente estudio que los reportado por Venkitanarayanan y col. (1999). Lo anterior puede deberse a las diferentes cepas utilizadas para cada uno de los estudios y la resistencia de éstas, pero puede afirmarse que para la inactivación de *L. monocytogenes* Scott A es más efectiva el AEN. El efecto de la temperatura fue similar al reportado arrojó resultados similares, ya que en nuestro estudio se logró una reducción 6.3 log, pero utilizando menores concentraciones y tiempos de contacto. Dichas diferencias, se pueden deber a las diferentes características de los tipos de agua electrolizada utilizadas.

Kim y col. (2000a), llevaron a cabo un estudio en el cual evaluaron la eficacia de dos tipos de AE producidas por equipos comerciales sobre varios microorganismos, ente los cuales se encontraba *L. monocytogenes*. Ellos encontraron que al tratar células libres de *L. monocytogenes* con AE ácida a 10 ppm de cloro residual durante 30 s, obtuvieron una reducción de 8.17 log, mientras que y a 60 s la reducción fue total. En nuestro estudio, al usar 10 ppm de AEN, a mayores tiempos de contacto, se obtuvo una reducción de 6.8 log por un tiempo de exposición de 8 min o la misma reducción con mayor concentración de AEN (20 ppm) por 4 min. Por lo tanto puede comprobarse que el AE ácida usada por Kim y col. (2000a), tiene un mayor poder inhibitorio de *L. monocytogenes* que el AEN, ya que fueron necesarias mayores concentraciones y tiempos de contacto para tener un efecto similar al reportado usando agua electrolizada ácida.

La CMB o CML del AEN sobre células libres de *L. monocytogenes* Scott A (Figura 15) fue de 30 ppm, lo cual nos indica que esta concentración es la necesaria para lograr un efecto bactericida sobre este microorganismo, ya que si se aplica en menores concentraciones se puede generar un efecto bacteriostático y causar un problema de salud pública por el riesgo latente de una contaminación del producto final, especialmente cuando se trata de microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* Scott A.

Kim y col. (2000b) evaluaron la efectividad del AE en la inactivación de biopelículas de *L. monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable, encontrando que al tratar sus biopelículas con AE ácida con 56 ppm de cloro residual durante 5 min, se reducía la población de  $1.9 \times 10^{10}$  UFC/82.5 cm<sup>2</sup> hasta valores por debajo del límite de detección, donde la mayor inactivación ocurrió en los primeros segundos de exposición. Comparando estos resultados con los nuestros (Figuras 18-20), se observa que la reducción de la población se debe a las diferentes características del AE, ya que el AE ácida presenta un pH de 2.6 y tiene una mayor concentración de ácido hipocloroso, que es el compuesto activo del agua electrolizada y por lo tanto se puede afirmar que el AE ácida tiene una mayor efectividad en menor concentración y menor tiempo de exposición que el AEN.

En la industria los alimentos se busca implementar el uso de agentes sanitizantes contra la formación de biopelículas, es por esto que Yang y col. (2009), evaluaron diferentes agentes sanitizantes comerciales contra biopelículas de *L. monocytogenes* sobre tablas para picar alimentos fabricadas en polietileno de alta densidad (PEAD) lisas y rugosas. Los sanitizantes utilizados se aplicaron según las recomendaciones del fabricante. Ellos encontraron que el mejor sanitizante fue el que contenía ácido láctico (0.18%), aplicado por un tiempo de 5 min y con un pH de 3.03 ya que producía una reducción alrededor de 6 log para ambas superficies. Menos efectivo fue el sanitizante basado en sales cuaternarias de amonio aplicado por un tiempo de 1 min y un pH de 6.24. También reportaron que la viabilidad de las células bacterianas formadoras de biopelículas puede verse afectada por el método de remoción de éstas, ya que no encontraron diferencia significativa en el recuento sobre las diferentes superficies, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que se encontró una diferencia significativa entre los dos materiales (vidrio y acero inoxidable) donde se llevó a cabo la cinética de crecimiento tanto para *L. lactis* UQ2 como para *L. monocytogenes* Scott A. Esto puede deberse a que el vidrio es más liso que el acero inoxidable, pues éste presenta estrías en su superficie, en las cuales se pueden quedar adheridas las células y dificultar la remoción de éstas por el método de frotación.

De acuerdo a lo reportado en la figura 22 acerca del crecimiento de la biopelícula de *L. lactis* UQ2, se tiene plena concordancia con lo reportado por Chmielewski y Frank (2003), donde describen que la formación de la biopelícula consiste inicialmente en la adhesión de las células libres, la formación de la microcolonia y la secreción de las sustancias poliméricas extracelulares.

La técnica de marcado de microorganismos FISH, provoca que éstos brillen bajo un microscopio de fluorescencia debido a que las sondas de oligonucleótidos para la detección *in situ* hibridizan selectivamente para cada microorganismo. Representa una alternativa a las técnicas tradicionales de cultivo para diferenciar los microorganismos formadores de la biopelícula. García-Almendárez y col. (2008), realizaron un estudio en el cual crecieron biopelículas de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A sobre una superficie de vidrio e hidridizaron estos microorganismos en la misma superficie, obteniendo una hidridación selectiva para cada uno de éstos, lo cual se observó en un microscopio de fluorescencia. De igual manera, en el presente trabajo fue posible visualizar las biopelículas de *L. lactis* UQ2 y de *L. monocytogenes* Scott A, sobre superficies de vidrio y acero inoxidable (por separado) ya que las sondas utilizadas son específicas para cada microorganismo.

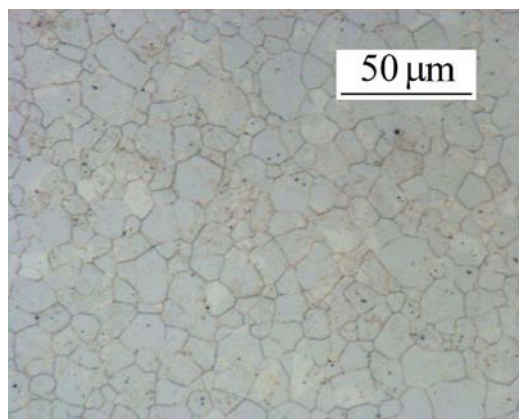


Figura 24. Micrografía de acero inoxidable austenítico, tipo 301 (Durán y col., 2009).

En la Figura 24, se observa una micrografía óptica de un acero inoxidable tipo 301, en la cual se aprecian maclas formadas por el tratamiento que se le da al acero durante el proceso de formación. En las Figura 22 d, 23 c y d, se puede observar la presencia de maclas (líneas negras irregulares), lo que nos asegura que dicha superficies corresponde a acero inoxidable. Probablemente esta característica del acero inoxidable se magnificó por el contraste utilizado; no obstante, en la Figura 22 c no se observan dichas características debido a la abundancia de SPE que impiden observar la superficie.

## VIII CONCLUSIONES

Se desarrolló la cinética de crecimiento de biopelículas de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A sobre dos superficies: vidrio y acero inoxidable.

El agua electrolizada neutra es un desinfectante efectivo sobre las células libres de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* Scott A.

La inactivación (hasta el límite de detección) de células libres de *L. lactis* UQ2 a una temperatura de 30°C se muestra cuando las células se exponen a una concentración de 30 ppm de agua electrolizada neutra por 0.5 min.

La inactivación (hasta el límite de detección) de células libres de *L. monocytogenes* Scott A a una temperatura de 30°C se muestra cuando las células se exponen a una concentración de 15 ppm de AEN por 1.5 min o 20 ppm por 0.5 minutos, y a una temperatura de 4°C, la inactivación se muestra a una concentración de 30 ppm por 0.5 min.

El agua electrolizada neutra es un desinfectante efectivo contra células de *L. monocytogenes* Scott A y de *L. lactis* UQ2 en forma de biopelícula formadas sobre superficies de vidrio y acero inoxidable.

La inactivación (hasta el límite de detección) de células formadoras de biopelículas de *L. lactis* UQ2 se muestra cuando éstas se exponen a una concentración de 500 ppm de agua electrolizada neutra por 1 min, en superficies de acero inoxidable y 500 ppm de agua electrolizada neutra por 45 min, en superficies de vidrio.

La inactivación (hasta el límite de detección) de células formadoras de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A se muestra cuando éstas se exponen a una concentración de 65 ppm de agua electrolizada neutra por 10 min, en superficies de

vidrio y 60 ppm de agua electrolizada neutra por 15 min o 65 ppm de AEN por 10 min, en superficies de acero inoxidable.

Las células en forma de biopelícula de *L. monocytogenes* Scott A y de *L. lactis* UQ2 son más resistentes que las células libres al exponerlas a agua electrolizada neutra.

No se encontró diferencia significativa sobre los preacondicionamientos realizados sobre las superficies de vidrio y acero inoxidable.

La técnica FISH es una alternativa para la detección de células de *L. monocytogenes* Scott A y de *L. lactis* UQ2 en forma de biopelícula.

Se recomienda probar el efecto del AEN en presencia de materia orgánica para evaluar condiciones más realistas acerca de la destrucción de biopelículas de *L. monocytogenes* en superficies en contacto con alimentos.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

**Baumann**, A. R., Martin E. S., Feng, H. Removal of *L. monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *Journal of Food Protection*. Vol. 72: 1306-1309.

**Betancourth**, M., Botero, J. E., Rivera, S. P. **2004**. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*. Vol. 35: 34-39.

**Bishop**, P. L. **1997**. Biofilm structure and kinetics. *Water Science Technology*. Vol. 36: 287-294.

**Brooks**, J. D., Flint, S. H. **2008**. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 43: 2163-2176.

**Bryers**, J. D. **1987**. Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnology Progress*. Vol. 3: 57-68.

**Carpentier**, B., Cerf, O. **1993**. Biofilm and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 75: 499-511.

**Chavant**, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontanie, M-N., Heubrand, M. **2002**. *L. monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68: 728-737.

**Chmielewski**, R. A. N., Frank, J. F. **2003**. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 2: 22-32.

**Daved**, H. M., O'Toole, G. A. **2000**. Microbiological biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 64: 847-867.

**Davidson**, P. M., Sofos, J. N., Branen, A. L. *Antimicrobials in Food*. 3th Ed. Taylor and Francis. United States of America. 659-677.

**Davis**, D. **2007**. [www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.005030](http://www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.005030)

- Durán, A. A. M. 2009.** Efecto de la predeformación en la vida a fatiga de un acero inoxidable austenítico metaestable. Universitat Politècnica de Catalunya. Tesis para obtener el título de Maestría en Ciencia de los Materiales. 73.
- Faber, J., Peterkin, P. 2000.** *L. monocytogenes*. In the microbiological safety of food. Aspen Publishers. Vol. 55: 1178-1232.
- Fernández, E. E. 2000.** Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. 1ra. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro: 43-48, 747-749.
- Fisher, C. W., Lee, D., Dodge, B. A., Hamman, K. M., Robbins, J. B. Martin, S. E. 2000.** Influence of catalase and superoxide dismutase on ozone inactivation of *L. monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66: 1405-1409.
- Fisher, C. W., y Martin, S. E. 1999.** Effects of iron and selenium on the production of catalase, superoxide dismutase, and listeriolysin O in *L. monocytogenes*. Journal of Food Protection. Vol. 62: 1206-1209.
- García-Almendárez, B. E., Cann, I. K. O., Martin, S. E., Guerrero, L. I., Regalado, C. 2008.** Effect of *L. lactis* UQ2 and its bacteriocin on *L. monocytogenes* biofilms. Food Control. Vol. 19: 670-680.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. 2005.** Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. Trends in Microbiology. Vol.13: 7-10.
- Hricova, D., Stephan, R., Zweifel, C. 2008.** Electrolyzed water and its application in the food industry. Journal of Food Protection. Vol. 71: 1934-1947.
- Huang, Y. R., Hung, Y. C., Hsu, S. Y., Huang, Y. W., Hwang, D. F. 2008.** Application of electrolyzed water in the food industry. Food Control. Vol.19: 329-345
- Kim, C., Hung, Y. C., Brackett, R. E. 2000a.** Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology. Vol. 61:199-207.
- Kim, C., Hung, Y. C., Brackett, R. E., Frank, J. F. 2000b.** Inactivation of *L. monocytogenes* biofilms by electrolyzed oxidizing water. Journal of Food Processing Preservation. Vol. 25: 91-100.
- Kumar, C. G., Anand S. K. 1998.** Significance of microbial biofilms in the food industry: a review. International Journal of Food Microbiology. Vol. 42: 9-27.



**Martin, S. E. y Fisher, C. W. 1999.** *L. monocytogenes*. The Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press., New York: 1288-1238.

**Meyer, B. 2003.** Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. International Biodeterioration and Biodegradation. Vol. 51: 249-253.

**Mittelman, M. W. 1998.** Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. Journal of Dairy Science. Vol. 81: 2760-4.

**Ongeng, D., Devlieghere, F., Debevere, J., Coosemans, J., Ryckeboer, J. 2006.** The efficacy of electrolysed oxidising water for inactivating spoilage microorganisms in process water and on minimally processed vegetables. International Journal of Food Microbiology. Vol. 109: 187-197.

**Park, C. M., Hung, Y. C., Doyle, M. P., Ezeike, G. O. I., Kim, C. 2006.** Pathogen reduction and quality of lettuce treated with electrolyzed oxidizing and acidified chlorinated water. Journal of Food Science. Vol. 66: 1368-1372.

**Roshni, A. M., Norris C. E., Venkitanarayanan K. 2009.** Effect of octenidine hydrochloride on planktonic cells and biofilms on *L. monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 75: 4089-4092.

**Sinde, E., Carballo, J. 2000.** Attachment of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. International Journal of Food Microbiology. Vol. 17: 439-47.

**Smoot, L., Pierson, M. 1998.** Effect of environmental stress on the ability of *L. monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. Journal of Food Protection. Vol. 61: 1293-1298.

**Stewart, P. 2008.** [www.erc.montana.edu/Res-Lib99/SW/Image\\_Library/Structure-Function/Full-image%20pages/Biofilmwb-jpg.htm](http://www.erc.montana.edu/Res-Lib99/SW/Image_Library/Structure-Function/Full-image%20pages/Biofilmwb-jpg.htm)

**Sutherland, I. W. 2001.** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology. Vol. 147: 3-9.

**Venkitanarayanan, K. S., Ezeike, G. O., Hung, Y. C., Doyle, M. P. 1999.** Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, y *L. monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65: 4276-4279.

**Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U. 2000.** Heterogeneity in Biofilms. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews. Vol. 24: 661-71.

**Yang, H., Kendall, P. A., Medeiros, L. C., Sofos, J. N.** Efficacy of sanitizing agents *L. monocytogenes* biofilms on high-density polyethylene cutting board surfaces. Journal of Food Protection. Vol. 72: 990-998.

**Zhang, T. C., Bishop, P. L. 1994.** Structure, activity and composition of biofilm. Water Science Technology. Vol. 29: 335-44.

## X. ANEXOS

Cuadro A1. Composición química en porcentaje de los aceros inoxidables austeníticos y aleaciones de níquel.

GRADO	304	304L	316	316L	317	317L	321
Designación UNS	S30400	S30403	S31600	S31603	S31700	S31703	S32100
<b>CARBONO (C) max.</b>	0.08	0.035*	0.08	0.035*	0.08	0.035*	0.08
<b>MANGANESO (Mn) max.</b>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
<b>FOSFORO (P) max.</b>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
<b>AZUFRE (S) max.</b>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
<b>SILICIO (Si) max.</b>	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
<b>CROMO (Cr) max.</b>	18.0 a 20.0	18.0 a 20.0	16.0 a 18.0	16.0 a 18.0	18.0 a 20.0	18.0 a 20.0	17.0 a 20.0
<b>NIQUEL (Ni)</b>	8.0 a 11.0	8.0 a 13.0	10.0 a 14.0	10.0 a 15.0	11.0 a 14.0	11.0 a 15.0	9.0 a 13.0
<b>MOLIBDENO (Mo)</b>	----	----	2.0 a 3.0	2.0 a 3.0	3.0 a 4.0	3.0 a 4.0	----
<b>OTROS ELEMENTOS</b>	----	----	----	----	----	----	Ti = 5xC min. y 0.70 max.

\* Se acepta un contenido máximo de carbono del 0.04% para tubos trefilados.

Cuadro A2. Cinética de crecimiento de *L. lactis* UQ2. Población bacteriana (log UFC/cm<sup>2</sup>) durante el proceso de formación de biopelículas sobre vidrio y acero inoxidable.

Día	Vidrio	Acero inoxidable
	Log (UFC/mL)	Log (UFC/mL)
0	9.79±0.1	9.68±0.1
1	7.12±0.09	7.43±0.49
2	7.06±0.14	6.99±0.74
3	6.83±0.18	7.42±0.20
4	7.18±0.12	8.13±0.15
5	8.06±0.08	7.32±0.04

Cuadro A3. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A. Población bacteriana (log UFC/cm<sup>2</sup>) durante el proceso de formación de biopelículas sobre vidrio y acero inoxidable.

Día	Vidrio	Acero inoxidable
	Log (UFC/mL)	Log (UFC/mL)
0	9.94±0.10	9.94±0.10
1	6.87±0.12	6.88±0.13
2	7.30±0.06	6.71±0.08
3	7.26±0.04	6.54±0.07
4	8.31±0.10	8.08±0.06
5	7.53±0.05	7.56±0.01

Cuadro A4. Inactivación de células libres de *L. lactis* UQ2 por la exposición a 100 y 500 ppm de AEN por 0.5, 1.5, 2, 4, 6 y 15 minutos.

Tiempo minutos	100 ppm	500 ppm	0 ppm
	Log (UFC/mL)	Log (UFC/mL)	Log (UFC/mL)
0	8.20±0.04	8.27±0.04	8.22±0.04
0.5	1.70±0.00	1.70±0.00	8.25±0.04
1.5	1.70±0.00	1.70±0.00	8.10±0.04
2	1.70±0.00	1.70±0.00	8.36±0.02
4	1.70±0.00	1.70±0.00	7.70±0.04
6	1.70±0.00	1.70±0.00	8.23±0.08
15	1.70±0.00	1.70±0.00	8.24±0.02

Cuadro A5. Inactivación de células libres de *L. lactis* UQ2 por la exposición a 5, 15, 30 y 50 ppm de AEN por 0.5, 1.5 minutos.

Tiempo minutos	5 ppm Log (UFC/mL)	15 ppm Log (UFC/mL)	30 ppm Log (UFC/mL)	50 ppm Log (UFC/mL)	0 ppm Log (UFC/mL)
0	8.06±0.08	8.06±0.08	8.06±0.08	8.06±0.08	8.06±0.08
0.5	9.28±0.12	8.10±0.07	7.18±0.03	1.70±0.00	8.25±0.08
1.5	9.24±0.06	8.29±0.08	8.52±0.01	1.70±0.00	8.06±0.08

Cuadro A6. Inactivación de células libres de *L. monocytogenes* Scott A por la exposición a 30, 50 y 500 ppm de AEN por 1, 5 y 10 minutos.

Tiempo minutos	30 ppm Log (UFC/mL)	50 ppm Log (UFC/mL)	500 ppm Log (UFC/mL)	0 ppm Log (UFC/mL)
0	8.79±0.00	8.79±0.00	8.79±0.00	8.79±0.00
1	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	8.79±0.00
5	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	8.79±0.00
10	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	8.79±0.00

Cuadro A7. Inactivación de células libres de *L. monocytogenes* Scott A por la exposición a 5, 10 y 20 ppm de AEN por 1, 4 y 8 minutos.

Tiempo minutos	5 ppm Log (UFC/mL)	10 ppm Log (UFC/mL)	20 ppm Log (UFC/mL)	0 ppm Log (UFC/mL)
0	8.72±0.05	8.72±0.05	8.72±0.05	8.72±0.05
1	8.63±0.00	8.63±0.00	4.56±0.01	8.63±0.14
4	8.72±0.00	5.16±0.05	1.70±0.00	8.72±0.05
8	8.54±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	8.54±0.05

Cuadro A8. Inactivación de células libres de *L. lactis* UQ2 por la exposición a 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 minutos a 30°C.

Tiempo Minutos	15 ppm Log (UFC/mL)	20 ppm Log (UFC/mL)	25 ppm Log (UFC/mL)	30 ppm Log (UFC/mL)	30 ppm Log (UFC/mL)
0	8.09±0.10	8.09±0.10	8.09±0.10	8.09±0.10	8.09±0.10
0.5	2.20±0.60	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	8.01±0.10
1	3.60±0.60	3.30±0.50	1.70±0.00	1.70±0.00	8.11±0.10
1.5	4.70±1.00	2.90±0.30	1.70±0.00	1.70±0.00	8.09±0.10
2	4.30±0.30	3.00±0.80	1.70±0.00	1.70±0.00	8.09±0.10

Cuadro A9. Concentración mínima bactericida (MBC) de AEN para *L. lactis* UQ2.

Concentración (ppm)	Log (UFC/mL)
15	4.70±1.00
20	2.90±0.30
25	1.70±0.00
30	1.70±0.00

Cuadro A10. Inactivación de células libres de *L. monocytogenes* Scott A por la exposición a 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 minutos a 30°C.

Tiempo minutos	15 ppm Log (UFC/mL)	20 ppm Log (UFC/mL)	25 ppm Log (UFC/mL)	30 ppm Log (UFC/mL)	30 ppm Log (UFC/mL)
0	8.80±0.10	8.80±0.10	8.80±0.10	8.80±0.10	8.80±0.10
0.5	2.90±0.30	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	8.88±0.20
1	3.30±0.40	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	8.83±0.20
1.5	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	8.71±0.10
2	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	8.80±0.10

Cuadro A11. Inactivación de células libres de *L. monocytogenes* Scott A por la exposición a 15, 20, 25 y 30 ppm de AEN por 0.5, 1, 1.5 y 2 minutos a 4°C.

Tiempo minutos	15 ppm Log (UFC/mL)	20 ppm Log (UFC/mL)	25 ppm Log (UFC/mL)	30 ppm Log (UFC/mL)	0 ppm Log (UFC/mL)
0	8.64±0.20	8.64±0.20	8.64±0.20	8.64±0.20	8.64±0.20
0.5	5.60±0.10	2.00±0.60	3.20±0.30	1.70±0.00	8.78±0.20
1	3.70±0.70	4.80±0.20	1.70±0.00	1.70±0.00	8.64±0.20
1.5	5.20±0.20	4.30±0.10	3.80±0.10	1.70±0.00	8.95±0.10
2	4.40±0.70	3.80±0.60	1.70±0.00	1.70±0.00	8.78±0.20

Cuadro A12. Concentración mínima bactericida (MBC) de AEN para *L. monocytogenes* Scott A.

Concentración (ppm)	Log (UFC/mL)
15	5.20±0.20
20	4.30±0.10
25	3.80±0.10
30	1.70±0.00

Cuadro A13. Preacondicionamientos para la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A sobre vidrio y acero inoxidable.

Material	Log (UFC/cm <sup>2</sup> )
Vidrio + L-lisina	6.34±0.09
Vidrio + leche	6.59±0.05
Vidrio	5.46±0.26
Acero inoxidable + L-lisina	6.34±0.19
Acero inoxidable + leche	6.48±0.19
Acero inoxidable	6.53±0.07

Cuadro A14. Inactivación de células de *L. lactis* UQ2 formadoras de biopelículas sobre vidrio y acero inoxidable por la exposición a 500 ppm de AEN por 1, 5, 30 y 45 minutos.

Tiempo minutos	Vidrio		Acero inoxidable	
	500 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	0 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	500 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	0 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )
0	7.07±0.04	7.07±0.04	7.07±0.04	7.07±0.04
1	6.25±0.07	8.05±0.11	1.70±0.00	7.07±0.04
5	6.89±0.07	8.24±0.04	1.70±0.00	6.32±0.06
30	7.54±0.08	8.01±0.05	1.70±0.00	7.27±0.08
45	1.70±0.00	7.49±0.11	1.70±0.00	5.20±0.07

Cuadro A15. Inactivación de células de *L. monocytogenes* Scott A formadoras de biopelículas sobre acero inoxidable por la exposición a 50, 100, 250 y 500 ppm de AEN por 10 minutos.

Tiempo minutos	50ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	100 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	250 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	500 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	0 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )
0	6.44±0.12	6.44±0.12	6.44±0.12	6.44±0.12	6.44±0.12
10	6.38±0.29	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	6.44±0.12

Cuadro A16. Inactivación de células de *L. monocytogenes* Scott A formadoras de biopelículas sobre vidrio por la exposición a 60 y 65 ppm de AEN por 10 minutos.

Tiempo minutos	60ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	65 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	0 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )
0	6.68±0.91	6.68±0.91	6.68±0.91
10	5.12±0.97	1.70±0.00	6.68±0.91
15	5.22±0.82	1.70±0.00	6.34±0.03



Cuadro A17. Inactivación de células de *L. monocytogenes* Scott A formadoras de biopelículas sobre acero inoxidable por la exposición a 60 y 65 ppm de AEN por 10 minutos.

Tiempo minutos	60ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	65 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	0 ppm Log (UFC/cm <sup>2</sup> )
0	6.41±0.30	6.41±0.30	6.41±0.30
10	3.49±0.22	1.70±0.00	6.41±0.30
15	1.70±0.00	1.70±0.00	6.84±0.09