

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

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

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

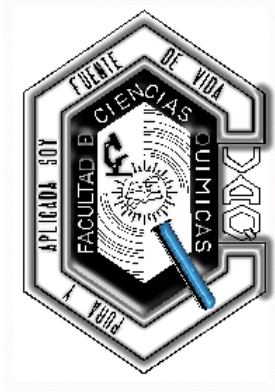
PRESENTA

**ELIZABETH EUGENIA CADENA MORENO**

DIRIGIDA POR

**Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

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

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ELIZABETH EUGENIA CADENA MORENO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**

**SINODALES**

**Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**M. en C. EUSTOLIA RODRÍGUEZ MUÑOZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**M. en C. BEATRIZ ÁLVAREZ MAYORGA**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

Aunque arme tienda contra mí un campamento,

    Mi corazón no temerá.

Aunque contra mí se levante guerra,

    Aun entonces estaré confiando.

Salmos 27:3

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi luz cuando estaba en oscuridad y mi plaza fuerte en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi mamá y papá por brindarme sus consejos, ayuda y paciencia para la realización de mi tesis. Por cuidarme y siempre estar al tanto de mí. Sin su ayuda no habría podido haber culminado mis estudios y mi tesis

A mis hermanos Edith, Poncho y Kika, por ser una fuente constante de alegría, por apoyarme y escucharme cuando lo necesitaba, por compartir conmigo tristezas, éxitos y fracasos, pero sobre todo porque han sido los mejores consejeros y creer en mí.

A Jazel Velasco por ser lo mejor que me ha pasado en la vida y por la confianza que has tenido en mí y tu gran apoyo que me has brindado en los momentos felices pero sobre todo en los días más negros de mi vida.

A Luis, Dunia y Rosa que han sido los mejores amigos que alguien pudiera tener y que han sido como hermanos.

Al Dr. Carlos Regalado y la Dra. Blanca por aceptarme en su laboratorio, brindarme su confianza y guiarme durante la realización de este trabajo. Gracias por su tiempo y valiosa contribución en mi formación como profesional.

A mis sinodales M. en C. Eustolia Rodríguez y al CEACA por confiar en mí y brindarme su ayuda y facilidad de prestarme el microscopio para la visualización de las biopelículas.

A M. en C. Beatriz Mayorga agradezco su paciencia y dedicación para llevar a cabo este proyecto.

A mis amigos del laboratorio Raquel, Rodrigo, Tere y Adri que me brindaron su amistad y por hacer cada día de trabajo divertido.

A Martha por ser una excelente maestra que me guió y me ayudó en la realización de mi tesis.

A Dr. Scott E. Martin por proporcionarme el microorganismo modelo para la realización de mi tesis.

Agradezco a CONACYT por la beca y el apoyo brindado al proyecto QRO-2008-CO2-101687 "Estudio de la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* en ambientes de procesamiento de alimentos y su biocontrol".

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Definición de biopelícula	3
II.1.1 Características	3
II.2 Importancia de las biopelículas	6
II.3 Etapas de formación	8
II.3.1 Adhesión	9
II.3.1.1 Factores que influyen la adhesión microbiana	9
II.3.1.2 Pre- acondicionamiento de la superficie	10
II.3.1.3 Tipos de adhesión	11
II.3.1.3.1 Adhesión pasiva y activa	12
II.3.1.4 Adhesión reversible	12
II.3.1.5 Adhesión irreversible	12
II.3.2 Formación de la microcolonia y producción de SPE	13
II.3.3 Maduración de la biopelícula	14
II.3.4 Dispersión	15
II.4 Modelos estructurales de Biopelículas	16
II.4.1 Modelo monocapa	17
II.4.2 Modelo multicapa tridimensional o de mosaico heterogéneo	17
II.4.3 Teoría actual: Modelo de Champiñón o Tulipán	18
II.5 Bacterias formadoras de biopelículas	19
II.5.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	19
II.5.1.1 Listeriosis	21
II.5.2 <i>Listeria monocytogenes</i> EDGe	22

II.6 Control de las biopelículas	23
II.6.1 Desinfección	25
II.6.1.1 Agua electrolizada	26
II.6.1.1.1 Producción y características	27
II.6.1.1.2 Mecanismo de acción	28
II.7 Métodos de detección de biopelículas	30
II.7.1 Microscopía de fluorescencia	31
II.7.2 Microscopía de barrido electrónico	31
III. HIPÓTESIS	33
IV. OBJETIVOS	34
IV.1 General	34
IV.2 Específicos	34
V. METODOLOGÍA	35
V.1 Materiales	35
V.1.1 Materiales biológicos	35
V.1.2 Antimicrobianos	35
V.2 Métodos	36
V.2.1 Activación y preparación del inóculo de <i>L. monocytogenes</i> EDGe	36
V.2.2 Preparación de las superficies	36
V.2.2.1 Superficies de vidrio	36
V.2.2.2 Superficies de acero inoxidable	36
V.2.3 Formación de las biopelículas	37
V.2.3.1 Preacondicionamiento de las superficies	37
V.2.3.2 Adhesión y formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> EDGe	37
V.2.4 Tratamiento de las biopelículas con agua electrolizada neutra	37
V.2.5 Recuperación de células formadoras de la biopelícula	38
V.2.6 Recuento de las células formadoras de biopelículas	38
V.2.7 Visualización por microscopía de epifluorescencia y electrónica de barrido antes y después del tratamiento con agua electrolizada neutra	38
V.2.8 Análisis estadístico	39
VI. RESULTADOS	40

VI.1 Efecto del agua electrolizada neutra (AEN) sobre células libres.	40
VI.2 Cinética de crecimiento de biopelícula de <i>Listeria monocytogenes</i> EDGe	42
VI.3 Efecto del agua electrolizada neutra (AEN) sobre biopelículas.	47
VII. DISCUSIÓN	56
IX. CONCLUSIONES	69
X. BIBLIOGRAFÍA	71
XI. ANEXOS	78

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Características de las biopelículas	5
2. Lista de enfermedades infecciosas causados por biopelículas.	7
3. Composición del agua electrolizada neutra baja en sales	35
4. Análisis estadístico de los tratamientos con AEN sobre células libres de <i>L. monocytogenes</i> EDGe	42
5. Análisis estadístico de la cinética de crecimiento de células de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelículas formadas en superficies de vidrio y acero inoxidable.	44
6. Análisis estadístico del efecto del AEN en células de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelícula formadas en superficies de acero inoxidable	51
7. Comparación entre las CMB de AEN (5%) y AEN baja en sales (0.5%) para la inactivación de células libres y en biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> EDGe y <i>L. monocytogenes</i> Scott A	55



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Proceso de formación de la biopelícula.	8
2. Dispersión de células de una biopelícula.	16
3. Modelo de la teoría de champiñón.	18
4. Celda electrolítica en la que se produce agua electrolizada.	29
5. Efecto del AEN sobre células libres de <i>L. monocytogenes</i> EDGe	41
6. Determinación de CMB a 1 minuto de contacto sobre células libres de <i>L. monocytogenes</i> EDGe	41
7. Cinética de crecimiento de células <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelículas sobre superficies de vidrio y acero inoxidable.	43
8. Visualización con microscopio de fluorescencia del crecimiento de células de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelículas sobre superficies de acero inoxidable	45
9. Visualización con microscopio de fluorescencia de la cinética de crecimiento de células de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelículas sobre superficies de vidrio	46
10. Visualización con microscopio óptico de crecimiento de células de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelículas sobre superficies de vidrio mediante tinción Gram.	47
11. Efecto del AEN sobre biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en acero inoxidable a 15, 20, 25 y 30 minutos de contacto	49
12. Efecto del AEN sobre células de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelículas en acero inoxidable a 15 y 20 minutos de contacto.	50
13. Determinación de CMB a 20 minutos de contacto sobre células de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelículas en acero inoxidable	51
14. Visualización del efecto del AEN sobre células de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelículas en acero inoxidable	52
15. Efecto del AEN sobre células de <i>L. monocytogenes</i> EDGe en biopelículas en vidrio	53

16. Visualización con microscopía de fluorescencia con filtro DAPI del efecto del AEN sobre células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas en vidrio

54

## RESUMEN

El disponer de alimentos inocuos ha conducido al desarrollo de tratamientos que permitan inhibir el crecimiento microbiano, mantener la calidad y las propiedades sensoriales de los alimentos. Sin embargo, un gran número de microorganismos son capaces de formar una comunidad compleja y organizada denominada biopelícula, en casi cualquier superficie que combine una alta disponibilidad de nutrientes y humedad. El objetivo de este trabajo fue estudiar el desarrollo de la formación de las biopelículas generadas por *Listeria monocytogenes* EDGe sobre superficies de vidrio y acero inoxidable, así mismo evaluar el efecto del agua electrolizada neutra (AEN) mediante el monitoreo de la inactivación de las células formadoras. La inactivación de células libres de *L. monocytogenes* EDGe se logró a una concentración de 9 ppm por 1 min de contacto. En biopelículas formadas por *L. monocytogenes* EDGe en superficies de acero inoxidable, la inactivación se logró a 70 ppm en 20 min de contacto y se encontró que esta concentración era igual de efectiva en las superficies de vidrio. La visualización en el microscopio de fluorescencia del efecto del AEN mostró la pérdida de bioluminiscencia y desprendimiento de SPE. Las células en biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe resultaron ser más resistentes a la acción del AEN que las células libres, por lo que el AEN mostró ser un desinfectante efectivo contra células libres y en forma de biopelículas de este microorganismo patógeno. Este trabajo sirve de pauta para futuras investigaciones para la evaluación del AEN como un desinfectante para frutas y vegetales.

## I. INTRODUCCIÓN

Disponer de alimentos inocuos es un reclamo universal de la sociedad por evitar las enfermedades asociadas a su consumo, lo que plantea un importante reto para la seguridad alimentaria para el desarrollo de tratamientos que permitan inhibir el crecimiento microbiano, mantener la calidad y las propiedades organolépticas de los alimentos.

La formación de biopelículas en la industria alimenticia representa un enemigo debido a que son la causa de diferentes problemas en el procesamiento de alimentos, pues se presentan problemas como impedir la transferencia de calor, la corrosión de metales de las superficies de los equipos y el taponamiento de filtros, además de que trae consigo la contaminación del producto con microorganismos patógenos. El crecimiento de biopelículas en ambientes de procesamiento de alimentos lleva a incrementar la posibilidad de que se presente una contaminación microbiana de los productos procesados. Estas biopelículas son heterogéneas y pueden contener microorganismos deterioradores y patógenos que han logrado organizarse y convivir con especies diferentes. Los microorganismos que se encuentran dentro de la biopelícula se encuentran protegidos, por la cual se incrementa la probabilidad de sobrevivir a los agentes antimicrobianos y subsecuentemente se presenta la contaminación de los alimentos por lo que se aumenta el riesgo de reducir la vida de anaquel y las enfermedades transmitidas por alimentos, ya que en el hombre, las biopelículas se encuentran asociadas con un gran número de procesos infecciosos.

Estas conformaciones microbianas presentan características especiales que las convierten en complejos muy estructurados para promover la cooperación de las células con las que forman el nicho colonizado, razón por la cual son difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen debido a que se sabe que un

microorganismo asociado a una biopelícula es 100 a 1000 veces más resistente a los desinfectantes que las formas libres.

El estudio de las biopelículas se hace cada vez más extenso y complejo, puesto que actualmente su formación se ha presentado en distintos sectores de la industria como marítimo, alimentos, aceites, papel, odontológico, medicina, tratamientos de aguas y doméstico. Es fundamental considerar que el desarrollo y formación de las biopelículas es perjudicial tanto para la salud y resulta en elevados costos de limpieza y mantenimiento en las empresas, debido a estas razones es de vital importancia mejorar las condiciones de un sistema contaminado.

## II. ANTECEDENTES

Desde hace tiempo se sabe que las bacterias tienen la capacidad de adherirse a superficies húmedas y formar una pequeña capa lo suficientemente delgada para ser visible al ojo humano, debido a que la mayoría de las células se pueden adaptar al ambiente porque se adhieren a la superficie con presencia de sustratos, que generalmente están contenidos dentro de una matriz polimérica de origen microbiano. Las primeras biopelículas fueron descubiertas en la superficie de los dientes por A. Van Leeuwenhoek usando un microscopio sencillo. Años más tarde, se comenzó a estudiar la importancia de las biopelículas y se apreció a las bacterias que se encontraban en ellas. El desarrollo de la primera teoría de las biopelículas establecía que la mayoría de las bacterias crecían adheridas a una superficie y que las células en forma adherida difieren profundamente de las células libres, sin embargo, el desarrollo de técnicas microscópicas más avanzadas permitió entender que las biopelículas consistían en microcolonias en una superficie y que éstas han desarrollado comunidades organizadas con características heterogéneas (Costerton y Stewart, 1999; Agle, 2007).

### II.1 Definición de biopelículas

Las biopelículas se definen como organizaciones microbianas de especies solas o múltiples compuestas por microorganismos viables y no viables que se encuentran agregados en una sustancia polimérica extracelular (SPE) formado por los mismos microorganismos y que se encuentran adheridos a una superficie ya sea blanda, animada o inanimada (Donlan, 2002).

#### II.1.1 Características

En la naturaleza, las biopelículas tienen un alto grado de organización y pueden existir en comunidades de especies solas o múltiples, formando una estructura de una sola capa, una estructura tridimensional, o formar agregados como gránulos o

flóculos y su supervivencia depende del comportamiento colectivo y coordinado de las células constituyentes de la biopelícula y pueden estar compuestas por 10-25% de células y 75-80% de matriz SPE (Watnick y Kolter, 2000).

Las biopelículas representan en sí una estrategia de supervivencia para los microorganismos que se encuentran en ella, pues proporciona una protección contra los mecanismos de erradicación microbiana y contra ambientes adverso), debido a que cuentan con un sistema de canales que permite el desarrollo de la biopelícula debido a la entrada de nutrientes y la salida de desechos. Los métodos convencionales como el uso de antibióticos y desinfectantes generalmente son ineficientes contra las biopelículas, ya que éstas son más resistentes a los antimicrobianos, como los antibióticos y desinfectantes que las células libre (Trachoo, 2003; Chmielewski y Frank, 2003; Betancourth y col., 2004).

El Cuadro 1 resume las principales características de las biopelículas. La heterogeneidad de las biopelículas que pueden estar conformadas por bacterias, hongos y protozoos, constituye una importante estrategia de supervivencia pues permite que estas comunidades sean únicas, y a su vez dicha heterogeneidad en la biopelícula se presentan diferentes estados metabólicos (Costerton y Stewart, 1999) y microambientes de pH, tensión de oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno.

La hidrodinámica juega un papel importante en el desarrollo de la biopelícula, pues estas organizaciones se desarrollan en una interfase líquido-sólido, que provee un ambiente ideal para la adhesión y crecimiento de microorganismos, donde la velocidad de flujo que lo atraviesa influye en el desprendimiento físico de los microorganismos. Las biopelículas cuentan con un sistema de canales que les permiten un flujo constante entre el transporte de nutrientes y la salida de desechos y junto con la formación del exopolímero que retarda la difusión de antimicrobianos y de solutos en general hacia el interior de la biopelícula, además de formar una

capa impermeable al ingreso de células y productos del sistema inmune donde sólo los microorganismos más superficiales se ven afectados (Costerton y Stewart, 1999, Betancourth y col., 2004).

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
Resistente a las defensas del hospedero, agentes antimicrobianos y detergentes
Percepción en quórum

---

Dentro de las biopelículas, los microorganismos se encuentran en un estado metabólico reducido lo que los hace resistentes a antimicrobianos y anticuerpos. Finalmente, una característica importante es la regulación y expresión de genes denominado percepción en quórum a través del cual las moléculas de señalización median la comunicación intercelular que inducen la expresión de genes de resistencia y supervivencia, propagación de colonias e inducir el crecimiento de otras dejando a los microorganismos más patógenos en una posición favorable (Betancourth y col., 2004).

La importancia de la percepción en quórum se debe a que éste permite la colaboración de las células que componen la biopelícula de manera que toda la comunidad se beneficie (Smith y col, 2004). Favorece el acceso de nutrientes y permite que en el interior de la biopelícula se desarrolle un ambiente favorable mediante la producción de una respuesta unificada que permita que las células sobrevivan bajo condiciones desfavorables (Asad y Opal, 2008). La percepción en quórum permite que las bacterias realicen tareas que beneficien a cada una de las



células que componen la estructura de la biopelícula, además de que influye en la virulencia y la resistencia a agentes antimicrobianos de la comunidad de la biopelícula (Annous y col., 2009)

## II.2 Importancia de las biopelículas

En un anuncio público divulgado por la organización mundial de la salud en el año 2002, se dio a conocer que las enfermedades infecciosas representan la segunda causa de mortalidad, por lo menos en Europa, con casi 15 millones de muertes, y el Centro de Control y Prevención de Enfermedades en 1999 estimó que las enfermedades transmitidas por alimentos son responsables de cerca de 76 millones de enfermedades que resultan en 325000 hospitalizaciones y 5000 muertes cada año en Estados Unidos (Mead y col., 1999). Los microorganismos que causan tantas complicaciones durante las infecciones pueden encontrarse organizados de manera compleja en forma de biopelículas que son difíciles de erradicar con antibióticos (Musk y Hergenrother, 2006).

Las bacterias en la mayoría de los ambientes, suelen organizarse en comunidades de agregados de microorganismos embebidos en una sustancia polimérica extracelular denominada biopelícula y representa un modo de crecimiento que permite que las bacterias sobrevivan en ambientes hostiles (Hall-Stoodley y Stoodley, 2009). Un gran número de infecciones en el humano son causadas por biopelículas incluyendo la caries dental, la enfermedad periodontal, otitis media, infecciones músculo-esqueléticos, neumonía entre otras enfermedades, en el Cuadro 2 se muestra una lista de infecciones en el humano que involucran biopelículas. Además con el desarrollo de la tecnología médica, aparecieron materiales que permitían ser implantados en el organismo sin causar reacciones adversas como los implantes de válvulas cardiacas, de cadera, marca-pasos e incluso implantes dentales; sin embargo, a pesar del gran avance de la tecnología y de la medicina, la introducción de un material nuevo al organismos representa una

nueva oportunidad para los microorganismos de formar biopelículas (Betancouth, 2004).

En el campo industrial, las biopelículas, también representan un gran problema, pues están implicados en diversos ámbitos constituyéndose en un gran peligro cuando están involucrados en el “bioensuciamiento”, que es la contaminación producida por la actividad microbiana sobre diferentes superficies, que generan corrosión de los equipos y tuberías y taponamiento de filtros y orificios. Las biopelículas ocasionan problemas que llegan a costar millones de dólares anualmente y representan una pérdida económica en la industria en la que lleguen a estar presentes (Donlan, 2002)

Cuadro 2. Lista de enfermedades infecciosas en el humano causado por biopelículas (Costerton y Stewart, 1999).

Infección o enfermedad	Bacterias comunes presentes en la biopelícula
Caries dental	<i>Streptococcus</i>
Otitis media	<i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones músculo-esqueléticas	<i>Staphylococcus</i>
Enfermedad del tracto biliar	<i>Escherichia coli</i>
Neumonía Fibrosa quística	<i>P. aeruginosa</i>

### II.3 Etapas de formación

Se ha demostrado que la formación de la biopelícula consiste en una adhesión reversible, adhesión irreversible, formación de la microcolonia y la producción de las sustancias poliméricas extracelulares por los mismos microorganismos 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, las cuales se multiplican rápidamente y se dispersan (Costerton y Stewart, 1999), es desencadenada por señales ambientales como la falta de nutrientes, composición del sustrato, química de la superficie y su topografía (Mittleman, 1998; Carpentier y Cerf, 1993).

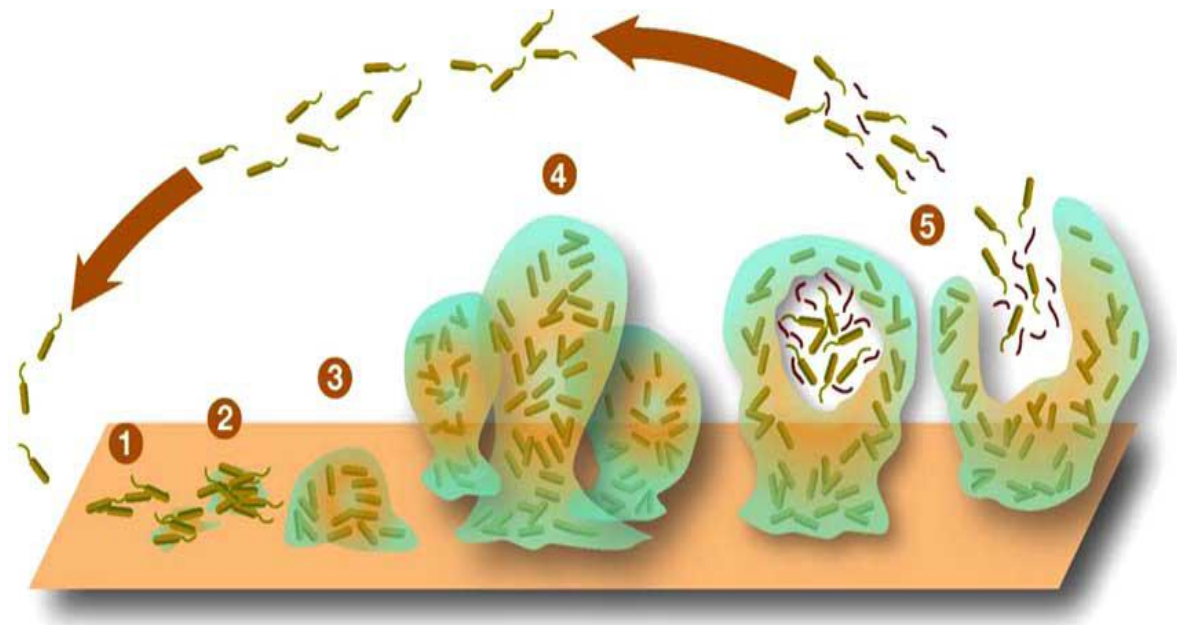


Figura 1. Proceso de formación de la biopelícula. La imagen muestra las etapas de formación:(1) adhesión de las células a la superficie; (2) formación de microcolonias, (3) producción del exopolisacárido extracelular; (4) maduración de la película; (5) dispersión de las células formadoras de la biopelícula (Costerton y Stewart, 2001., Musk y Hergenrother, 2006).

### II.3.1 Adhesión

La adhesión bacteriana a las superficies inertes se encuentra afectada por diferentes propiedades físicas y químicas de la célula, del sustrato de la superficie y la composición del medio circundante. Los genes responsables de la adhesión, producción de SPE y de la síntesis de proteínas de adhesión de la célula son activados en respuesta al estímulo del ambiente (estrés y falta de nutrientes) y de la percepción en quórum (Chmielewski y Frank, 2003).

#### II.3.1.1 Factores que influyen la adhesión microbiana

La adhesión de las bacterias en las superficies depende de la alta energía libre o de la capacidad para humedecerse de las superficies y del tipo de sustrato. Es decir, las superficies como el acero inoxidable y vidrio que poseen una alta energía libre y que son hidrofílicas permiten una mayor adhesión microbiana que las superficies que son hidrofóbicas, como el nylon y caucho. En general, las bacterias se adhieren mejor a las superficies hidrofílicas formando una monocapa, que a las hidrofóbicas que tienden a adherirse en forma de grumos, puesto que ésta ocurre principalmente en la región hidrofílica de la interfase hidrofílica-hidrofóbica (Bos y col., 2000)

La topografía de la superficie como el caucho y nylon, materiales usados en la fabricación de utensilios o partes de equipos en la industria, son erosionados con el uso continuo, lo que les brinda la característica de atrapar a los microorganismos, brindar refugio, propiciar el crecimiento microbiano y protección contra la limpieza y sanitización. Chmielewski y Frank (2003) observaron que los defectos presentes en las superficies se encuentran asociados con el incremento en la adhesión bacteriana.

El tiempo de contacto entre las células y el sustrato, también es un factor que influye de manera determinante en la adhesión. Lunden y col. (2000) demostraron que *Listeria monocytogenes* tienen la habilidad de adherirse mejor a las superficies y que requiere de un corto tiempo de contacto para que se lleve a cabo la adhesión.

La superficie celular de las bacterias tiene una carga negativa y se comportan como partículas hidrofóbicas y el grado de hidrofobicidad decrece generalmente cuando la tasa de crecimiento también lo hace, es decir, se incrementa la adhesión cuando los microorganismos se encuentran en su mayor actividad metabólica. En el caso de *L. monocytogenes* la óptima actividad metabólica y adhesión se encuentra a 30°C y un pH 7. El pH y los nutrientes influyen en la carga de la superficie celular que repercute en la adhesión, la presencia de glucosa y ácido láctico disminuye la electronegatividad de la superficie celular de *L.monocytogenes* al neutralizar las cargas y promover la producción de proteínas de estrés (Hood y Zottola, 1997). Diversos estudios sugieren que la habilidad de adhesión de las bacterias está controlada por proteínas de adhesión, lipopolisacáridos y ácidos lipoteicos. En general, los microorganismos deficientes en lipopolisacáridos exhiben una reducción en la hidrofobicidad de la superficie y se reduce la capacidad para adherirse a superficies hidrofílicas (Daved y O'Toole, 2000).

#### II.3.1.2 Pre- acondicionamiento de la superficie

El proceso de pre-acondicionamiento de las superficies es uno de los factores que influyen en la adhesión inicial y numerosos estudios han demostrado que la adhesión ocurre mejor en superficies que han sido pre-acondicionadas, este proceso permite que las superficies cambien rápidamente al adsorber moléculas orgánicas e iones cargados en cuestión de segundos, cuya presencia promueve la adhesión (Barnes y col., 1999).

El pre-acondicionamiento también depende de las propiedades de la superficie de contacto, debido a que las moléculas orgánicas se adhieren mejor en superficies con alta energía libre y los ácidos grasos se adhieren mejor a superficies a superficies hidrofóbicas. Generalmente, la presencia de una capa de materia orgánica en una superficie puede ayudar a la adhesión de las células (Agle, 2007).

McEldowney y Fletcher (1987), indicaron 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. En un estudio realizado por Hood y Zottola (1997), estudiaron el efecto de la adhesión bacteriana usando acero inoxidable preacondicionando con 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 preacondicionó la superficie con leche diluida.

La población inicial que se adhiere primero puede cambiar la carga de la superficie, por lo que las siguientes especies que se adhieren lo hacen mediante asociación célula-célula, en el caso de *L. monocytogenes* tiene una mayor probabilidad de adherirse a una superficies de acero inoxidable en presencia de *Pseudomonas fragi*, lo que indica que la adhesión de una segunda especie confiere mayor estabilidad a la población de la biopelícula (Hood y Zottola, 1997)

### II.3.1.3 Tipos de adhesión

La adhesión a una superficie puede ser activa o pasiva dependiendo de la motilidad de las células (Chmielewski y Frank, 2003).

#### II.3.1.3.1 Adhesión pasiva y activa

La adhesión pasiva se debe a la gravedad, difusión y dinámica de fluidos. En la adhesión activa la superficie celular y sus propiedades facilitan la adhesión inicial, este tipo de adhesión se debe a la presencia de flagelos, pilis, proteínas de adhesión, cápsula y la carga de la superficie de la célula (Kumar y col., 1998). La adhesión ocurre generalmente en 5 a 30 segundos y ocurre en dos fases: la adhesión reversible seguida de una adhesión irreversible (Mittleman, 1998).

#### II.3.1.4 Adhesión reversible

La adhesión reversible inicia cuando se presenta una interacción débil entre la bacteria con el sustrato. Consta de interacciones de Van der Waals, hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas. Durante esta adhesión, la bacteria exhibe movimientos brownianos y es fácilmente removida por fuerzas de rompimiento

#### II.3.1.5 Adhesión irreversible

La adhesión irreversible resulta del anclaje de los apéndices o de la producción de SPE. La unión o enlace entre los apéndices de la células, como los flagelos, pilis, proteínas de adhesión, con el sustrato envuelven fuerzas pequeñas como la interacción dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces iónicos covalentes. Estos enlaces ocurren en pocas horas de contacto y numerosos estudios revelan que la adhesión irreversible toma de 20 min a 4 horas de 4 a 20°C.

Cabe mencionar, que hay varios factores importantes que influyen en la adhesión irreversible, una de ellas es la temperatura, es decir, una temperatura alta se encuentra asociada con la disminución de adhesión debido a que se producen proteínas de estrés en la superficie de la célula. A altas temperaturas (37°C), *L. monocytogenes* pierde sus flagelos y su superficie celular se vuelve

electronegativa, se sugiere que la pérdida de los apéndices cambia las propiedades de la superficie celular que lleva al decrecimiento de la habilidad de las bacterias para adherirse a las superficies (Daved y O'Toole, 2000). A una temperatura de 15 a 20°C, la superficie celular de *L. monocytogenes* tiene una carga negativa, lo que sugiere que la carga negativa es debido a la presencia de flagelos y glicolípidos (Briandet y col., 1999). Estudios realizados por Smoot y Pierson en 1998, demuestran que las altas temperaturas están asociadas a la disminución de la habilidad de adhesión de las bacterias. Por otro lado, Daved y O'Toole (2000) encontraron que los flagelos le brindan a la bacteria la capacidad de moverse hacia los sitios específicos de adhesión. Los pilis actúan como velcro para adherir a las bacterias a la superficie y actúan como receptores químicos dirigiendo a las células a los sitios de adhesión (Chmielewski y Frank, 2003).

Remover la biopelícula en esta fase de la adhesión a las superficies requiere de grandes fuerzas de rompimiento, enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes y/o calor que rompan químicamente la adhesión (Gelinas y col., 1994; Bower y col., 1996).

### II.3.2 Formación de la microcolonia y producción de SPE

Este proceso ocurre después de la adhesión irreversible bajo condiciones apropiadas de crecimiento. La formación de la microcolonia resulta de la agregación simultánea de microorganismos que consta del reclutamiento de bacterias en su forma libre del medio a través de la comunicación celular o percepción en quórum y el crecimiento de los microorganismos y está acompañado de la producción de la sustancia polimérica extracelular (SPE) en respuesta al estímulo del ambiente como presión osmótica, pH y temperatura (Chmielewski y Frank, 2003).



La SPE, son sustancias altamente hidratadas con un porcentaje de agua alrededor de 85-95%, lo que indica que puede incorporar a su estructura una gran cantidad de agua mediante puentes de hidrógeno, es producida por los mismos microorganismos, se encuentra compuesta principalmente por glicocálix (75%) y puede contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y otras sustancias poliméricas (Donlan, 2002), este exoplímero forma una matriz adherente en donde los microorganismos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias. Sin embargo, la composición exacta de la SPE no se conoce pero se sabe que se compone de sustancias poliméricas. En 1987, Allison y Sutherland, demostraron que la producción de la SPE no ocurre siempre inmediatamente después de la adhesión, sino que en bacterias Gram negativas su producción iniciaba después de 5-6h después de la adhesión.

La SPE actúa como una barrera física responsable de que los agentes antimicrobianos fracasen en el intento de penetrar en el interior de las biopelículas; sin embargo, la SPE no es una barrera impenetrable, pero retarda la penetración y difusión los de antimicrobianos (Costerton y Stewart, 1999; Trachoo, 2003).

### II.3.3 Maduración de la biopelícula

Si las condiciones son apropiadas para la aglomeración y el crecimiento de los microorganismos, las microcolonias empiezan a formarse y la biopelícula comienza a madurar, en esta fase la biopelícula se convierte en una estructura tridimensional organizada que consiste en una monocapa o multicapas de células en grupos que se mantienen unidas mediante el SPE con canales de agua que atraviesan la estructura (Watnick y Kolter, 2000). Las microcolonias forman estructuras resistentes a agentes antimicrobianos (Costerton y Stewart, 1999). Es importante recalcar que en las biopelículas maduras la energía se usa principalmente para producir exopolisacáridos, los cuales se usan como nutrientes (Watnick y Kolter, 2000).

Conforme la biopelícula madura se va adaptando a los cambios de nutrientes, oxígeno y de población y se forman microcolonias discretas separadas unas de otras por canales de agua. En 1997, en un estudio realizado por Bishop se demostró que las biopelículas maduras generan un gradiente de potencial redox a través de la estructura, lo que permite crear un hábitat para una población microbiana heterogénea. Una vez que la biopelícula madura, aumenta su densidad, creándose un ambiente anaerobio en el interior que incrementa el ácido y la acumulación de gas insoluble. Las condiciones anteriores debilitan la estructura de la biopelícula causando un desprendimiento de los polímeros que se encuentran en la superficie (Bryers, 1987).

#### II.3.4 Dispersión

Para que las bacterias en su forma adherida colonicen nuevas áreas de la superficie es necesario que cuenten con sistemas de dispersión, la estructura en el interior de la biopelícula forman cavidades por donde las células son liberadas, la biopelícula se dispersa para permitir que las células se muevan e inicie la formación de una nueva biopelícula (Watnick y Kolter, 2000). Algunas zonas de la biopelícula pueden romperse con el flujo del medio y las células se liberan y pueden colonizar nuevas superficies (Costerton y Stewart, 1999). Las células que se liberan de la biopelícula se depositan en nuevos nichos donde las células mantienen sus características de biopelículas adheridas a una superficie (Betancourth y col., 2004). Diversos estudios realizados han sugerido que así como existen señales químicas para que se lleve a cabo la maduración de la biopelícula, también existen señales para que se dé la liberación de las células. La liberación de células de *P. aeruginosa* de una biopelícula, indica que la acción se debe a que se sintetizan enzimas que digieren alginatos mediante señales químicas liberadas por percepción en quórum. La Figura 2 muestra una biopelícula madura en la cual se

está llevando a cabo la fase de dispersión de las células para colonizar nuevas superficies.

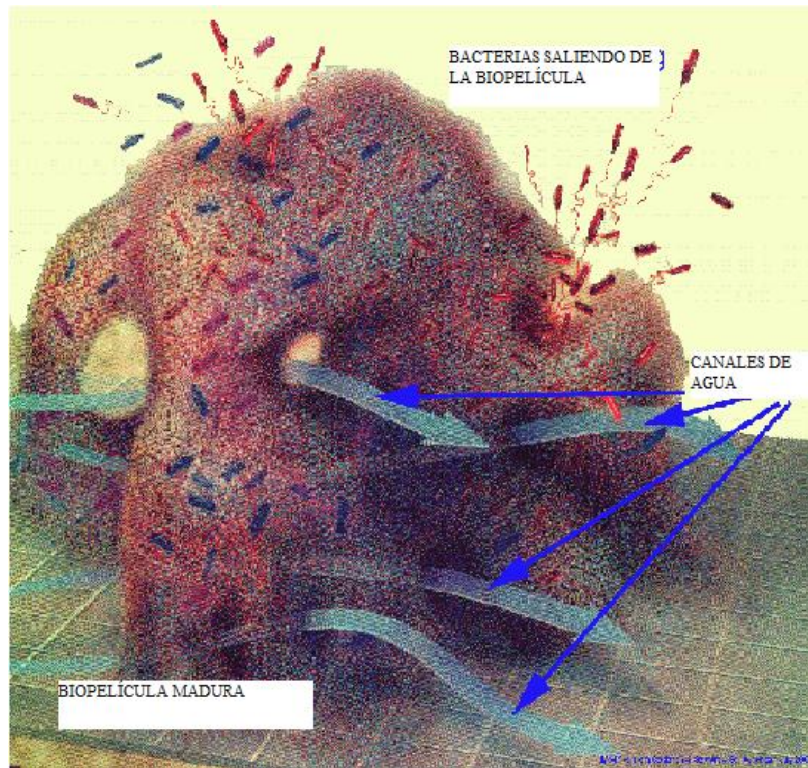


Figura 2. Dispersión de células de una biopelícula. La biopelícula madura dispersa las células para dar inicio de una nueva biopelícula en otra área de la superficie (Costerton y Stewart, 2001).

#### II.4 Modelos estructurales de biopelículas

Varios grupos de investigadores han estudiado la estructura de las biopelículas, concluyendo que cada biopelícula es única. Con el microscopio confocal se reveló que las biopelículas no es una monocapa de células homogéneas, sino que en realidad, son heterogéneas y consisten de microcolonias, que son la unidad básica de la biopelícula. Además los datos obtenidos revelan que la biopelícula

representa una forma de estrategia de sobrevivencia. Se han propuesto diferentes modelos que se basan en la observación de la estructura de las biopelículas mediante la visualización a través de la disponibilidad de la tecnología microscópica, estos modelos explican el desarrollo y propiedades de las biopelículas (Trachoo, 2003; Agle, 2007; Kokare y col, 2009) .

#### II.4.1 Modelo monocapa

El modelo continuo de la monocapa fue la primera teoría propuesta que explicaba la estructura de las biopelículas. Este modelo describe a las biopelículas como lisas, planas y homogénea y explica la actividad química de las biopelículas basado en la difusión, los efectos físicos del flujo, la presión y el flujo de desprendimiento en sistemas de distribución de agua (Bishop 1997; Wimpenny y col., 2000).

#### II.4.2 Modelo multicapa tridimensional o de mosaico heterogéneo

Este modelo surgió por la observación con el microscopio de contraste diferencial mediante el cual se describe a las biopelículas como un mosaico heterogéneo con microorganismos aglomerados que se mantienen unidos mediante SPE. El modelo de mosaico heterogéneo se basa en conceptos biológicos simples: las células metabolizan sustratos, excretan, mantienen el nivel de energía, se dividen o mueren dependiendo de la disponibilidad de los nutrientes. Si la célula se divide, empuja a las demás hacia un lado. Si la célula muere, los componentes celulares son reciclados para ser usados como nutrientes. Este modelo asume que las células de las biopelículas tienen una alta afinidad entre ellas, causando que se fijen entre sí y permite explicar la incorporación de diversas comunidades microbianas con características propias (Wimpenny y col., 2000).

### II.4.3 Teoría actual: Modelo de champiñón o tulipán

La teoría actual se basa principalmente en la evidencia provista por la microscopía de barrido confocal que permitió la visualización de las biopelículas como una estructura de champiñón o tulipán con torres, pedestales y canales de agua. La estructura superior de las biopelículas es una estructura con forma de tallo delgado que se encuentra atravesado por canales de agua. Las torres contienen estelas, las cuales pueden romperse y liberar células que colonizan nuevas superficies (Figura 3). Este modelo propone un crecimiento rápido de la célula en la periferia de la biopelícula, y un crecimiento lento en el interior. Los microorganismos en el interior de la biopelícula pueden competir, operar independientemente, cooperar o ser depredadores. Y los canales de agua permiten la dispersión e intercambio de moléculas orgánicas, cationes metálicos y metabolitos. Los nutrientes quedan atrapados y se concentran en la matriz de la biopelículas y se mueven a través de ella mediante difusión (Chmielewski y Frank, 2003).

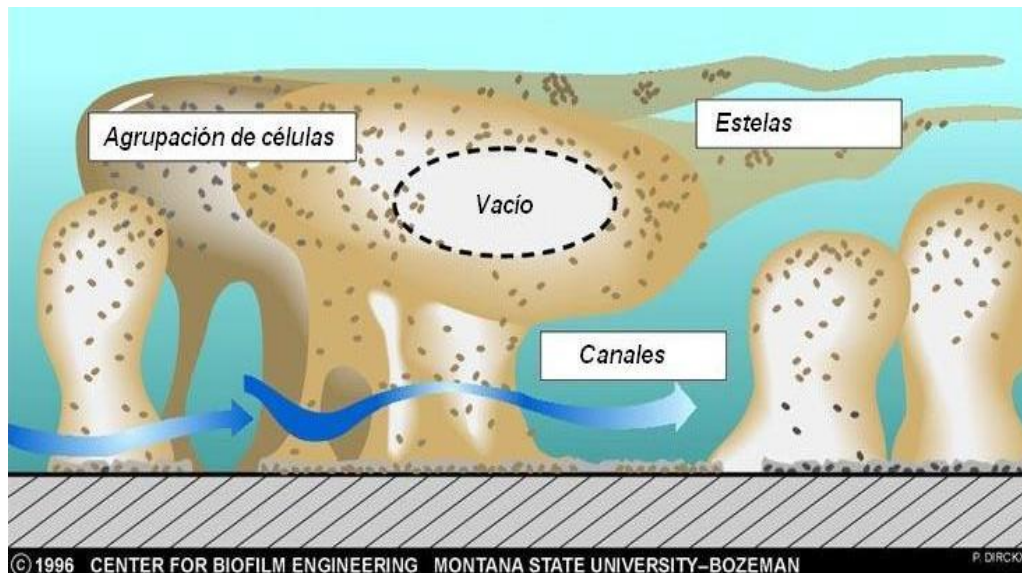


Figura 3. Modelo de la teoría de champiñón. Describe a las biopelículas como una estructura en forma de champiñón compuesta de canales de agua, torres y estelas (Stewart, 2008)

## II.5 Bacterias formadoras de biopelículas

Como es bien sabido, las biopelículas pueden estar compuestas por una gran variedad de microorganismos, en las que encontramos bacterias, hongos y protozoos. Algunas especies patógenas que pueden formar biopelículas y que son responsables de infecciones en el humano son *Pseudomona*, *Bacillus*, *Salmonella* y *Listeria*.

Las especies de *Pseudomona* son microorganismos deterioradores que se encuentran en ambientes de procesamiento de alimentos que incluyen coladeras y pisos e incluso se pueden encontrar en frutas y vegetales. En forma de microorganismo adherido, forma una gran cantidad de SPE y se ha demostrado que puede formar biopelículas en superficies de acero inoxidable y pueden coexistir en biopelículas formadas por *Listeria*, *Salmonella* y otros patógenos (Bagge y col., 2001). Otra especie de microorganismo que puede formar biopelículas son las especies de *Bacillus*. La característica peculiar de esta especie es que sobrevive a procesos de calentamiento de alimentos y formar biopelículas con otras bacterias termorresistentes (Frank, 2000). *Salmonella* puede ser aislada de equipos de procesamiento que se encuentran húmedos que constituyen un nicho ideal para la formación de biopelículas. Puede adherirse y formar biopelículas en superficies comúnmente encontradas en la industria de alimentos como plásticos, cemento y acero inoxidable

### II.5.1 *Listeria monocytogenes*

El control de *L. monocytogenes* es un gran reto en la industria de alimentos procesados, especialmente en aquellas industria donde se producen productos listos para consumir y que se encuentran expuestos al ambiente después de someterse a un tratamiento térmico (Blaschek y Wang, 2007). *L. monocytogenes* es

un patógeno con la capacidad de adherirse y crecer en superficies frías y húmedas que son ideales para la formación de biopelículas como el acero inoxidable, plástico, superficies de policarbonato y otros materiales que se encuentran en contacto directo con los alimentos y que no se encuentran expuestos adecuadamente a agentes sanitizantes, ya sea por el mal diseño del equipo o mal mantenimiento. 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 (Tresse y col., 2007). Por lo que el crecimiento de este microorganismo en plantas procesadoras de alimentos reviste especial importancia no solamente por los aspectos ligados a la vida útil de los productos y a la salud del consumidor, sino también porque es indicativo de procedimientos ineficientes de limpieza y desinfección.

Puede reconocerse que *L. monocytogenes* es un patógeno oportunista y es el causante de provocar listeriosis en individuos entre los que se incluyen las personas de tercera edad, las mujeres embarazadas, los recién nacidos y las personas inmunocomprometidas como las que se encuentran enfermas de SIDA, (Gandhi y Chikindas, 2006; Fernández, 2008).

En el género *Listeria* existen varias especies y mediante estudios de hibridación de ADN, en 1974 se sugirió la conformación de 6 especies afines: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. denitrificans*, que excluyen dos más, *L. murrayi* y *L. grayi* (Fernández, 2008). Entre éstas, la *L. monocytogenes* es causa importante de una amplia gama de enfermedades en los humanos causan enfermedades como la listeriosis. (Brooks y col., 2005).

*L. monocytogenes* puede encontrarse en una gran variedad de alimentos procesados y crudos. Alimentos como la leche, productos lácteos, carnes como puerco, res, salchichas y productos frescos como los garbanzos, coliflor, pescado han sido asociados a la contaminación con *Listeria* (Gandhi y Chikindas, 2007).

*L. monocytogenes* es un bacilo corto gram positivo, aerobio y anaerobio facultativo no esporulado, de 1.2x0.5µm. Es catalasa positivo y oxidasa negativo. Tienen valor especial, y en particular para la identificación de *L. monocytogenes*, la fermentación de tres azúcares. Manitol, xilosa y ramnosa y la prueba de hemólisis. Es un microorganismo móvil en caldos incubados a 22-25°C; pero a 37°C no se expresa el gen que codifica para la flagelina y la bacteria no manifiesta movilidad, característica que la distingue de *L. innocua* que con frecuencia aparece móvil a 37°C. *L. monocytogenes* presenta un carácter halotolerante pues crece en medios con una concentración de 10% NaCl. Una cualidad predominante del microorganismo es su notable potencial psicrótrofo. Los límites de temperatura para el crecimiento son inusualmente amplios con un rango entre 2-45°C, con óptima entre 30 y 37°C. Sobrevive y crece a temperaturas de refrigeración (2-4°C), por lo que es uno de los muchos factores que hacen del control de este microorganismo patógeno tan difícil. El pH óptimo es de 7.0 con límites de 4.5 a 8.0 y tiene la capacidad para desarrollar a bajos valores de pH (pH=4.39) siempre y cuando el medio de cultivo aporte los nutrientes esenciales. Presenta una actividad de agua (Aa) óptimo requerido para desarrollar de 0.97 y diversos reportes indican que la Aa mínima para su desarrollo se encuentra por debajo, esto es, a 0.92. Cifras más bajas de Aa no permiten el crecimiento del microorganismo (Gandhi y Chikindas, 2006; Fernández, 2008).

#### II.5.1.1 Listeriosis

La listeriosis es una enfermedad causada por la ingesta de células de *L. monocytogenes* que puede presentarse en personas pero especialmente de la tercera edad, embarazadas, recién nacidos y persona inmunocomprometidas que incluyen a personas con SIDA y las personas que están en tratamiento contra el cáncer. Esta enfermedad tiene un periodo de incubación largo que oscila entre 1 o varias semanas, lo que hace difícil identificar al microorganismo patógeno y rastrear



al alimento contaminado, la dosis infectante podría situarse entre unos cientos y unos cuantos miles de células de *L. monocytogenes*. La listeriosis se manifiesta de diferentes maneras en el hombre, debido a que puede ser asintomático o presentarse síntomas como malestar general, náuseas, diarrea, fiebre ligera, dolor muscular y puede terminar en somnolencia, convulsiones repentinas y coma. En casos severos, la enfermedad manifiesta meningitis, septicemia y otras infecciones del sistema nervioso central. En las mujeres embarazadas, la listeriosis presenta fiebre, calosfríos, cefalea y abortos espontáneos. La enfermedad generalmente tiene un curso fulminante, con letalidad de 70% en pacientes sin tratamiento o aplicado tardíamente (Gandhi y Chikindas, 2007; Fernández, 2008).

### II.5.2 *Listeria monocytogenes* EDGe

Recientemente el Departamento de microbiología de la Universidad de Cork en Irlanda (2007) modificó a *L. monocytogenes* mediante un sistema basado en un vector de integración cromosómica denominado pPL2lux que contiene un operón sintético *lux* derivado de *Photorhabdus luminescens* y que ha sido perfeccionado para usarse en bacterias Gram positivas para el etiquetado de *L. monocytogenes* presente en alimentos, infecciones y en el estudio de tumores (Riedel y col., 2007). Esta integración exitosa indica la resistencia adquirida de *L. monocytogenes* EDGe al cloranfenicol y la integración del plásmido es estable a la ausencia del antibiótico al menos por 50 generaciones (Bron y col., 1996). *L. monocytogenes* EDGe presenta bioluminiscencia durante su crecimiento en caldo infusión de cerebro y corazón y caldo LB y pueden ser monitoreadas por densidad óptica a 600nm ( $OD_{600}$ ) y la luminiscencia puede ser medida en unidades relativas de luz (RLU) (en fotones/s).

Riedel y otros (2009) reportan que *L. monocytogenes* EDGe puede formar biopelículas estáticas en poliestireno después de 16h de crecimiento y la

integración del plásmido de bioluminiscencia no afecta la formación de la biopelícula

## II.6 Control de las biopelículas

Las biopelículas que están compuestas por microorganismos patógenos representan un serio problema en la industria de alimentos y ponen en peligro la inocuidad éstos. Los microorganismos asociados a las biopelículas pueden sobrevivir por periodos extensos de tiempos en superficies en las que se encuentran adheridos. De hecho, el 80% de las bacterias que se encuentran en las industrias se adhieren a las superficies de los equipos y forman biopelículas. (Annous y col., 2009). Una vez que la biopelícula se ha formado, limpiar la superficie se vuelve cada vez más difícil debido a la presencia de una sustancia adherente conocida como SPE y suelen mostrar resistencia a los germicidas.

Los procedimientos de limpieza deben ser eficaces para remover cualquier sólido que contenga microorganismos o que promueva el desarrollo y crecimiento de éstos. Los procedimientos de limpieza incluyen una remoción con agua fría o caliente seguida de la aplicación de agentes químicos, enjuague o sanitización. El lavado es una etapa importante y crítica en la sanidad de los equipos en la planta procesadora de alimentos debido a que la presencia de residuos de alimentos interfieren en general con la actividad de los germicidas, es decir, el efecto antimicrobiano de una sustancia disminuye al ser aplicada sobre cualquier superficie que esta inadecuadamente lavada. En general el proceso de lavado consiste en poner un agente limpiador con la suciedad y evitar que ésta se deposite en otro lugar. Un agente limpiador debe romper los grumos de las partículas, generar productos solubles en agua a partir de material insoluble, emulsificar la grasa en glóbulos muy finos, penetrar los materiales a través de poros o fracturas, evitar la sedimentación de las partículas suspendidas sobre el equipo y utensilios. La eficacia del agente limpiador se ve afectada por la

concentración a la que se aplique, tiempo de contacto, temperatura y participación de alguna fuerza de arrastre o de frotación, es decir, si el líquido se aplica por chorro o provocando alguna turbulencia y el frotado manual contribuye al desprendimiento de la suciedad (Fernández, 2008).

La mayoría de los agentes limpiadores son alcalinos, ácidos, aniónicos y neutros. Los agentes alcalinos como el hidróxido de sodio actúan como detergentes y emulsificantes que retiran la suciedad orgánica como grasas y proteínas, la mayoría de estos agentes químicos trabajan en un rango de temperatura que va de 43-47°C. Sin embargo, la desventaja de estos agentes es que son muy corrosivos. Los limpiadores ácidos pueden ser inorgánicos como el ácido clorhídrico, fosfórico, nítrico y sulfúrico, y también pueden ser orgánicos como el ácido láctico y cítrico. Estos compuestos se usan para remover incrustaciones y disolver precipitaciones minerales causadas por la dureza del agua. El pH bajo de estos limpiadores inhibe el crecimiento de las bacterias durante el periodo en el que el equipo no está en funcionamiento, además puede causar lisis de las bacterias como *P. fragi* adherida a la superficie. Los agentes aniónicos como el EDTA es efectivo contra bacterias Gram positivas, afecta la permeabilidad de la célula y actúa sinérgicamente con otros agentes, algunos agentes aniónicos como el dodecil sulfato sódico liberan a las bacterias de las superficies en las que se encuentra adherida. Y los agentes neutros o no aniónicos producen una gran cantidad de espuma y no son afectados por la dureza del agua (Fernández, 2008; Reinemann y col, 1998).

El proceso de limpieza puede remover hasta un 90% o más de los microorganismos asociados, sin embargo, no los elimina e inactiva, debido a que éstas pueden depositarse en nuevos nichos y con el tiempo, el agua y los nutrientes necesarios pueden formar biopelículas. Debido a esta razón un procedimiento de limpieza efectivo debe romper o disolver la matriz de la SPE de la biopelícula con la intención de que el agente antimicrobiano llegue a las bacterias que se encontraban en el interior de ella. Cabe destacar que la aplicación de una

agente desinfectante es esencial para inactivar los microorganismos (Chmielewski y Frank, 2003).

### II.6.1 Desinfección

El proceso de desinfección se refiere a la destrucción física de los microorganismos cuya actividad compromete la inocuidad de los alimentos, la eficacia de este proceso depende de cuatro factores: los microorganismos (tipo y número), el sustrato sobre el cual se encuentran (presencia de materia orgánica), la estructura del material (que permita el acceso directo del germicida a los microorganismos) y el germicida (concentración, tiempo de contacto y temperatura). La susceptibilidad a un germicidas varía entre microorganismos; algunos pueden ser inactivados desde el primer contacto con el germicida y otros pueden sobrevivir y desarrollar resistencia a los germicidas (Fernández, 2008)

Algunos germicidas usados comúnmente en la industria alimenticia son los halógenos, el peróxido de hidrógeno, los compuestos clorados, ácidos y los compuestos de sales cuaternarias de amonio (Chmielewski y Frank, 2003). Los compuestos clorados son germicidas muy poderosos debido a su poder oxidante y a su poder desinfectante, ejercen efectos a través de diversos mecanismos que afectan procesos metabólicos vitales como la inhibición de enzimas que participan en el metabolismo, en la biosíntesis de proteínas y en el transporte activo a través de la membrana, lesiones en las cadenas de ADN y mutaciones. El hipoclorito comercial puede ser de sodio o calcio y ambos son germicidas con un amplio espectro y aunado a su bajo precio son los más utilizados en la industria alimentaria. No manchan, muestran baja toxicidad, pero son irritantes, corrosivos, con olor propio y pierden fuerza con la presencia de materia orgánica.

La forma activa es el ácido hipocloroso (HClO), molécula generada mediante el ión hipoclorito a pH ácido de 4 a 7, forma moléculas como cloraminas con las aminos

que también son usados como agentes germicidas. El dióxido de cloro no reacciona con los compuestos de amonio o materia orgánica y muestra una mayor actividad oxidante y su poder germicida no es afectado por el pH, no reacciona con las aminas y fenoles y es menos corrosivo que los hipocloritos, pero su poder germicida se ve afectada por la temperatura. Las sales cuaternarias de amonio se usan principalmente en los pisos, paredes y contenedores de almacenamiento, son compuestos tenso-activos a base de cloruros de alquil dimetil bencil amonio, con escaso poder detergente pero son buenos germicidas, son muy estables, inodoros e incoloros, no son irritantes ni corrosivos, pero su actividad disminuye con la dureza del agua.

El peróxido de hidrógeno y el ácido peracético son sanitizantes usados en la industria de alimentos, estos germicidas ejercen un poder bacteriostático o bactericida dependiendo de la concentración usada. Su efectividad depende de la temperatura, pH y la cepa del microorganismo. La acción de estos compuestos involucra la formación de compuestos oxigenados tóxicos como el radical OH que daña a los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. En el caso del ácido peracético es más potente que el peróxido de hidrógeno y el cloro y se ha encontrado que es efectivo contra las bacterias de la biopelícula. La actividad antimicrobiana de estos compuestos se extiende a la inactivación de esporas (Chmielewski y Frank, 2003).

#### II.6.1.1 Agua electrolizada

El lavado de los alimentos frescos es un procedimiento de limpieza que se usa comúnmente en la industria; sin embargo, el lavado no hace que los alimentos se encuentren libres de microorganismos y otras sustancias antimicrobianas a concentraciones aceptables en la industria no inactivan una alta cantidad de microorganismos patógenos. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de

tratamientos antimicrobianos efectivos que inactiven a los microorganismos patógenos de los alimentos (Venkitanarayanan y col., 1999).

El agua electrolizada es uno de los tratamientos antimicrobianos que surgieron como un nuevo concepto desarrollado en Japón que ha ganado interés como desinfectante usado en la agricultura, odontología, medicina y en la industria alimenticia. Se ha demostrado tener una actividad bactericida contra la mayoría de microorganismos patógenos que son importantes en la seguridad de alimentos incluyendo *Pseudomona aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, entre otros. Tiene la ventaja de ser más efectiva, más económica y menos corrosivo que los agentes desinfectantes tradicionales (Huang y col., 2008).

#### II.6.1.1.1 Producción y características

El agua electrolizada se produce al hacer pasar una solución diluida de cloruro de sodio (12%) o agua desionizada con una baja concentración de cloruro de sodio (0.1%) a través de una celda electrolítica en la que el ánodo y el cátodo, con un voltaje de 19.8 y 10V respectivamente, que se encuentran separados por una membrana o un diafragma como se muestra en la Figura 4.

Durante el proceso de electrólisis, el cloruro de sodio disuelto en el agua se disocia en cargas negativas como los iones cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) e hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y en iones positivos, el ión sodio ( $\text{Na}^+$ ) y en el ión hidrógeno ( $\text{H}^+$ ). Los iones negativos se adsorben en el ánodo liberando un electrón cada uno para convertirse en radicales libres que se convierten en oxígeno gas ( $\text{O}_2$ ), cloro gas ( $\text{Cl}_2$ ), ión hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) y ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ), dos radicales de cloro pueden formar también el cloro libre en forma de gas, mientras que en el cátodo, cada ión

$\text{Na}^+$  recibe un electrón y se convierte en sodio metálico que se combina con una molécula de agua formando hidróxido de sodio (NaOH) e hidrogeno gas ( $\text{H}^+$ ). (Hricova y col., 2008; Venkitanarayanan y col., 1999; Huang y col., 2008). Por lo tanto, durante la electrólisis se producen dos tipos de agua: el agua electrolizada ácida y el agua electrolizada alcalina o básica.

El agua electrolizada ácida (AEA) es la que se produce en el ánodo, tiene un pH bajo (2.3-2.7), un potencial de oxidación alto mayor de 1000 mV y 50-80 ppm de cloro residual, se usa ampliamente en la desinfección de vegetales evitando así las enfermedades, tiene un alto efecto bactericida contra microorganismos patógenos como *E. coli*, *Salmonella entereditis* y *Listeria monocytogenes*. Por otro lado el agua electrolizada alcalina, producido en el cátodo, tiene un pH alto (10.0-11.5) y un potencial de oxidación bajo (-800 a -900mV) (Huang y col., 2008), debido a que tiene un potencial fuerte de reducción se usa para remover la suciedad de utensilios (Hsu, 2005).

El agua electrolizada neutra se obtiene combinando las dos soluciones obtenidas en el ánodo y cátodo, tiene un pH neutro 6.0-8 con un potencial de oxido reducción de 750 mV y 20ppm de cloro activo. Debido a su pH neutro no es corrosivo con los equipos (Deza y col., 2003).

#### II.6.1.1.1 Mecanismo de acción

En general, las bacterias suelen crecer en un rango de pH de 4 a 9. Las bacterias aeróbicas crecen sobre todo en un rango de potencial oxidante de +200 a +800 mV, mientras que las bacterias anaerobias crecen bien en- 700 a -200 mV. Un alto potencial de oxidación en el agua podría causar la modificación de los flujos metabólicos y la producción de ATP, probablemente debido al cambio en el flujo de electrones en las células (Huang y col., 2008).

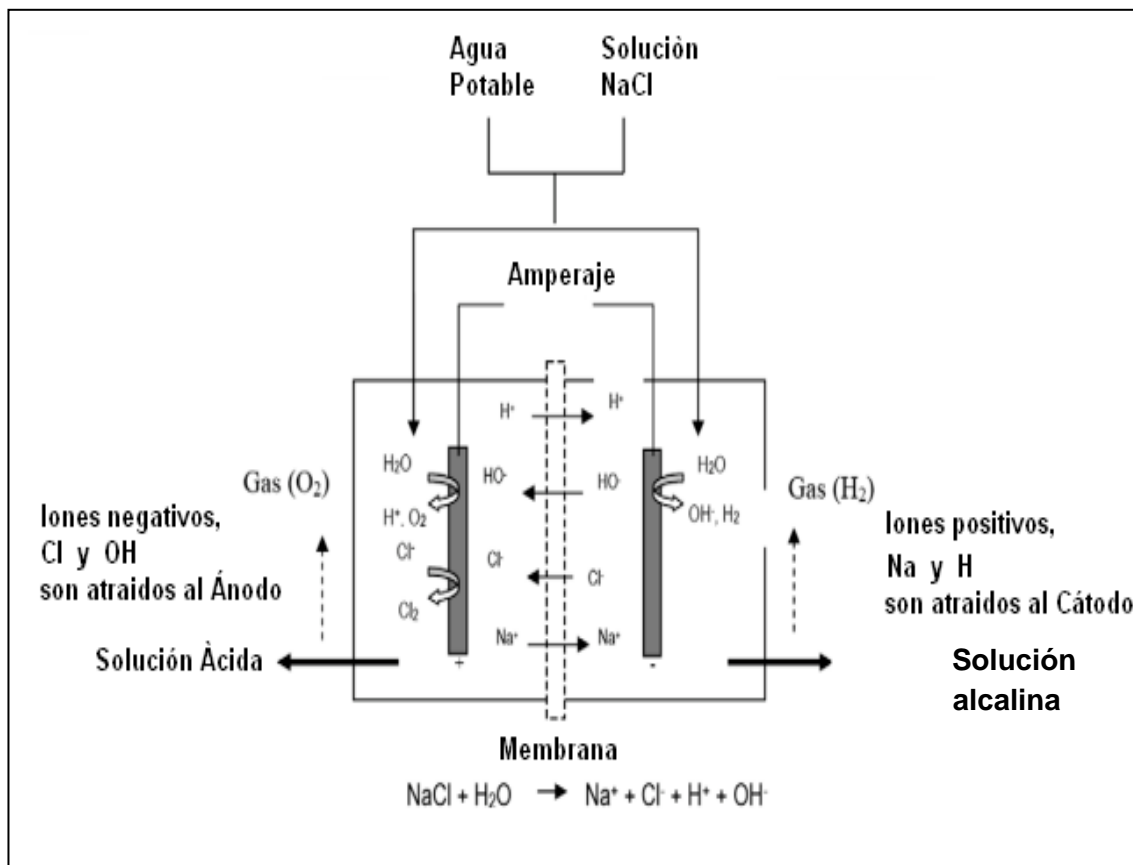


Figura 4. Celda electrolítica compuesta por dos electrodos en la que se produce agua electrolizada (Huang y col., 2008).

El potencial oxidante de una solución es un indicador de la capacidad para oxidar o reducir. Un potencial positivo y alto indican un gran poder oxidante. El pH bajo junto a un potencial oxidante alto y la presencia de cloro residual hacen del agua electrolizada un sanitizante efectivo, debido a que un potencial oxidante alto libera oxígeno (O<sub>2</sub>) por la ruptura de los enlaces débiles e inestables de los radicales ·OH, cuando el oxígeno entra en contacto con los compuestos causa que éstos pierdan electrones y causa su ruptura y el cambio de funciones. En el caso de los microorganismos, la oxidación daña la membrana de la célula, creando un desbalance en los procesos metabólicos causando su muerte (Huang y col., 2008; Bialka y col., 2004). El pH bajo sensibiliza la membrana celular de las bacterias



ocasionando la entrada del ácido hipocloroso (HClO) al interior de la célula (Bialka y col., 2004). El ácido hipocloroso (HClO) es el más activo de los compuestos clorados, al parecer elimina a los microorganismos al interrumpir la síntesis de proteínas, inhibe la oxidación de glucosa debido a que se oxidan los grupos sulfhidrilo de ciertas enzimas importantes en el metabolismo de los carbohidratos, reacciona con los ácidos nucleicos, purinas y pirimidinas, causando un desbalance del metabolismo al destruir enzimas claves, induce lesiones en el ADN, forma de derivados tóxicos a partir de citosina y la creación de aberraciones cromosomales. El ácido hipocloroso también produce el radical  $\cdot\text{OH}$  que actúa en los microorganismos, otros factores que influyen en la potencia bactericida son las concentraciones del ión hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) y cloro gas ( $\text{Cl}_2$ ) (Huang y col., 2008).

El dióxido de cloro actúa a nivel de la membrana celular y no reacciona con la materia orgánica, oxida los fenoles (Fernández, 2000).

## II.7 Métodos de detección de biopelículas

Existen numerosos métodos usados en la detección y monitoreo de las biopelículas. Entre los cuales cabe destacar los métodos convencionales como el recuento en placa, en la que se remueve la microflora de la superficie con ayuda de una esponja o torunda, la cual se transfiere a un diluyente y posteriormente se hace un recuento en agar donde bacterias específicas, levaduras y hongos pueden aislarse y ser identificados usando agares selectivos. La ventaja de los métodos convencionales es que no son caros y son sencillos, pero la desventaja es que consumen demasiado tiempo. Otro método usado en la detección de las biopelículas incluye la visualización directa de éstas en microscopio, la microscopia de epifluorescencia incluye la determinación de células viables, estructura de la biopelícula, formación de las microcolonias, pH y distribución química de la biopelícula (Chmielewski y Frank, 2003; Trachoo, 2003).

Actualmente se cuenta con una amplia variedad de métodos para la visualización directa de las biopelículas, como las microscopias de contraste diferencial, de fuerza atómica y cabe destacar la microscopia electrónica de barrido y la microscopía de fluorescencia, estos métodos son usados para observar la microestructura, metabolismos y el desarrollo de la biopelícula (Kokare y col., 2009).

#### II.7.1 Microscopía de fluorescencia

Se utiliza para visualizar muestras capaces de emitir fluorescencia; esto es, capaces de emitir una determinada longitud de onda cuando previamente ha iniciado sobre ellas una luz de menor longitud de onda. La fluorescencia puede ser debida a que determinadas células posean sustancias con esta capacidad, como por ejemplo las clorofilas (autofluorescencia), o por haber sido previamente tratadas con un colorante fluorescente. La microscopía de fluorescencia se usa habitualmente en microbiología diagnóstica, así como en ecología microbiana (Brock y col., 1998).

#### II.7.2 Microscopía de barrido electrónico (SEM)

Mediante esta técnica la muestra a estudiar se recubre con una fina capa de metal pesado, como el oro. El haz de electrones del SEM barre la superficie de la muestra; los electrones desviados por la capa de metal son recogidos y proyectados sobre una pantalla para producir una imagen. En el SEM se pueden observar muestras de cierto tamaño, y la profundidad de campo es extraordinaria. Con el SEM se puede obtener un amplio rango de magnificaciones que van desde 15X hasta 100.000X, pero solo es posible visualizar la superficie de los objetos. Todos los microscopios electrónicos incorporan cámaras que permiten fotografiar las muestras. Este tipo de fotografías se denominan microfotografías electrónicas.

Las ventajas de la utilización del microscopio electrónico de barrido para observaciones superficiales son (Brock y col., 1998).

- La facilidad de preparación de las muestras.
- Obtención inmediata de la imagen correspondiente.
- Una baja intensidad del haz electrónico, el cual reduce el daño a la muestra y la contaminación superficial.
- Una enorme profundidad de campo que origina imágenes tridimensionales a una resolución razonable.

### III. HIPÓTESIS

El uso del agua electrolizada neutra tiene un efecto antimicrobiano sobre las células de *Listeria monocytogenes* EDGe en biopelículas formadas en superficies de vidrio y acero inoxidable.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Estudiar la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EDGe sobre superficies vidrio y acero inoxidable usadas en la industria de alimentos y su control mediante el uso de agua electrolizada neutra.

### IV.2 Específicos

- Diseñar la metodología para el desarrollo de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EDGe sobre superficies de vidrio y acero inoxidable.
- Estudiar la formación de las biopelículas de la cepa bioluminiscente *Listeria monocytogenes* EDGe y su cinética de crecimiento.
- Estudiar el efecto del agua electrolizada neutra sobre las células de *Listeria monocytogenes* EDGe en biopelículas.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Materiales biológicos

Para el desarrollo del estudio se trabajó con una cepa bioluminiscente de *Listeria monocytogenes* EDGe resistente a cloranfenicol donada por el Dr. Collin Hill, Universidad de Cork, Irlanda.

#### V.1.2 Antimicrobianos

Agua electrolizada baja en sales (DESY®-BM)

Agua activada DESY®-BM con una concentración de cloro libre total (especies oxidantes) de 234 mg/L, pH 6.5-7.5 y REDOX de 800-1000 mV proporcionada por la empresa EcoRus Technology. El Cuadro 3 muestra la composición del agua electrolizada neutra baja en sales.

Cuadro 3. Composición del agua electrolizada neutra baja en sales

Compuesto	Composición (%)
H <sub>2</sub> O	99.45
NaCl	0.5
HClO (ácido hipocloroso)	0.0375
ClO <sup>-</sup> (ión hipoclorito)	0.0075
ClO <sub>2</sub> (dióxido de Cloro)	0.004
O <sub>3</sub> (Ozono)	0.001
Total	100

(Ficha Técnica de Agua Activada Desy®-BM, 2010)

## V.2 Métodos

### V.2.1 Activación y preparación del inóculo de *L. monocytogenes* EDGe

La cepa se conservó en chaquiras de vidrio a  $-70^{\circ}\text{C}$  con una suspensión conteniendo 10% (v/v) glicerol y 10% (v/v) leche como agentes criogénicos. Para su activación, se tomó una conserva de *L. monocytogenes* EDGe y se colocó en 10 mL de caldo LB suplementado con cloranfenicol y se incubó por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación a 180 rpm. Finalizando el periodo de incubación se tomó los 10 mL del caldo y se resuspendió en 90 mL de caldo LB suplementado con cloranfenicol incubándose por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación a 180 rpm. Al finalizar el tiempo de incubación, los 100 ml del caldo con la cepa se centrifugaron a 10000 g por 10min, se removió el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en la misma cantidad de solución salina 0.85% estéril, y se centrifugaron nuevamente para lavar las células a las mismas condiciones. La pastilla se resuspendió en 5 mL de la misma solución salina (Moltz y Martin 2004).

### 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 de vidrio se lavaron con un detergente aniónico y se enjuagaron con agua destilada. Se colocaron cuatro portaobjetos en una caja Petri y se esterizaron en seco por 1h a  $180^{\circ}\text{C}$ .

#### V.2.2.2 Superficies de acero inoxidable

Se usarón chips de acero inoxidable tipo 304, grado No. 4 (pulido mecánico, rugosidad promedio de 0.2 - 1.0 mm) de 2.54 cm de largo por 2.54 cm de ancho para una superficie total de  $6.45\text{ cm}^2$ . Antes de cada experimento, se lavaron con

agua destilada caliente, se cepillaron con un detergente aniónico para remover cualquier material orgánico no deseado y se enjuagaron con agua destilada. Se colocaron cuatro chips en una caja petri y se esterizaron en autoclave por 15 min a 121°C (García-Almendárez y col., 2008).

### V.2.3 Formación de las biopelículas

#### V.2.3.1 Preacondicionamiento de las superficies

Las placas vidrio y de acero inoxidable se pre-acondicionaron con 100 µL de una solución de L-lisina 0.1 mM que se colocaron sobre cada una de las placas se extendió con un asa de platino estéril, se dejó actuar por 5 minutos y se retiró el exceso.

#### V.2.3.2 Adhesión y formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EDGe

Las placas se inocularon con 100 µL del cultivo activado, resuspendido en una solución salina 0.85% y se dispersaron en el área de tratamiento con asa de platino estéril, se colocaron en contenedores conteniendo agua estéril, se cerraron para mantener la humedad relativa de 100% y se incubaron a 37°C. Las placas inoculadas se lavaron cada 24 h con 10 ml del amortiguador de fosfatos (50mM, pH 7) y se alimentaron con 100 µL de medio LB suplementado con cloranfenicol.

### V.2.4 Tratamiento de las biopelículas con agua electrolizada neutra

Las biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe al quinto día de su formación se sumergieron en 15 mL de agua electrolizada a diferentes tiempos (0, 15, 20, 25 y 30 min) y concentraciones de cloro libre total presente en el AEN (0, 28, 30, 37, 70 y 117 ppm), diluyendo el AEN con agua HPLC estéril para llevarla a dichas concentraciones, para el tratamiento control las biopelículas se sumergieron en 15



mL de agua desionizada estéril, posteriormente se sumergieron en una solución amortiguador neutralizante (Difco) el cual contenía 0.0043% de fosfato monopotásico, 0.016% de tiosulfato de sodio y 0.5% de aril sulfonato durante 10 segundos para neutralizar el cloro residual del agua electrolizada. Las placas de tratamiento control son sumergidas directamente en la solución amortiguadora neutralizante durante 10 segundos.

#### V.2.5 Recuperación de células formadoras de la biopelícula

Las células se recuperaron por frotación con un hisopo húmedo estéril con solución salina 0.85%. Se frotó vigorosamente el área de tratamiento con el hisopo estéril de manera vertical, horizontal y dos veces en forma diagonal y se introdujeron en un tubo con 10 mL de solución salina 0.85%, se homogenizaron en vortex por 1 minuto y se hicieron diluciones seriadas.

#### V.2.6 Recuento de las células formadoras de biopelículas

El recuento de las células se realizó por la técnica Miles-Misra, para la cual se dividió la caja con agar LB suplementado con cloranfenicol en 3 secciones agregando en cada sector 20  $\mu$ L de cada dilución por triplicado, se incubaron por 48 horas a 37°C para posteriormente contarse con cuenta colonias (Leica).

#### V.2.7 Visualización por microscopía de epifluorescencia y electrónica de barrido antes y después del tratamiento con agua electrolizada neutra.

Las placas de ambos materiales de los cuatro días se guardaron para realizar la visualización directa con un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioskope 40), se utilizó un filtro DAPI con una longitud de onda de excitación de 360 a 340nm y una longitud de onda de observación por arriba de 410nm. El quinto día se realizó un recuento de las células formadoras de la biopelícula.

Se realizó una visualización de las biopelículas de los cuatro días de *Listeria monocytogenes* EDGe, las cuales se fijaron con una solución de glutaraldehído 2% (v/v) por 24 horas. Posteriormente se trataron con una solución de tetraóxido de osmio 2% (v/v) por 2 horas y se deshidrataron lavándolas con etanol con distintos grados [50, 80, y 100% (v/v)] por 15 minutos. Se aplicó hexametildisilazano por 2 horas para alcanzar el punto crítico de secado de los chips y finalmente se recubrieron con una fina capa de metal pesado de oro-paladio y se observaron con un microscopio XL 30 ESEMFEG (García-Almendárez y col., 2008).

#### V.2.8 Análisis estadístico

Para la evaluación del efecto del agua electrolizada en las biopelículas *L. monocytogenes* EDGe, los tratamientos se realizaron por triplicado y se analizaron los datos con el programa JMP para evaluar el efecto de las distintas concentraciones y el tiempo de contacto del agua electrolizada. Se evaluaron las diferencias significativas usando la prueba de Tukey.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Efecto del agua electrolizada neutra (AEN) sobre células libres.

Se analizó la diferencia en la concentración mínima bactericida (CMB) definida como la reducción de unidades formadoras de colonias de 99.9% por debajo de la población inicial (Brooks y col., 2005), de células de *L. monocytogenes* EDGe en forma libre y aquellas que se encuentran en forma de biopelícula.

El efecto del AEN en la inactivación se evaluó usando diferentes concentraciones de cloro libre total en el AEN (0, 5, 7, 9 y 12 ppm) a distintos tiempos de contacto (0, 1, 3 y 5 minutos). Partiendo de un inóculo inicial en el experimento de 8.7 log, se realizó el tratamiento con agua destilada grado HPLC (High Performance Liquid Chromatography) como tratamiento control, es decir, 0 ppm de cloro libre total logrando disminuir 1 log, el uso de una concentración de 5 ppm por un minuto, al igual que el tratamiento control, logra disminuir 1 log de la población inicial; sin embargo, después de 3 minutos las poblaciones son semejantes. Usando una concentración de 7 ppm por 3 minutos, se presenta un efecto bacteriostático, pues se logra disminuir la población inicial de 8.7 log a 4.6 log cuando se exponen las células no adheridas al AEN. Al exponer las células libres a 9 y 12 ppm de cloro libre total se observa un efecto bactericida, pues se logra su inactivación en un tiempo de 1 minuto de contacto, logrando disminuir la población hasta niveles no detectables (1.7 log) para la técnica de Miles-Misra (Figura 5).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se procedió a determinar la CMB para la inactivación de células libres de *L. monocytogenes* EDGe. La Figura 6 muestra que la disminución en la población de *L. monocytogenes* EDGe se ve favorecida por el aumento en la concentración de AEN. Se estableció que una concentración de 9 ppm de cloro libre total en el AEN a 1 min de contacto corresponde a la CMB para la inactivación de células libres de *Listeria*.

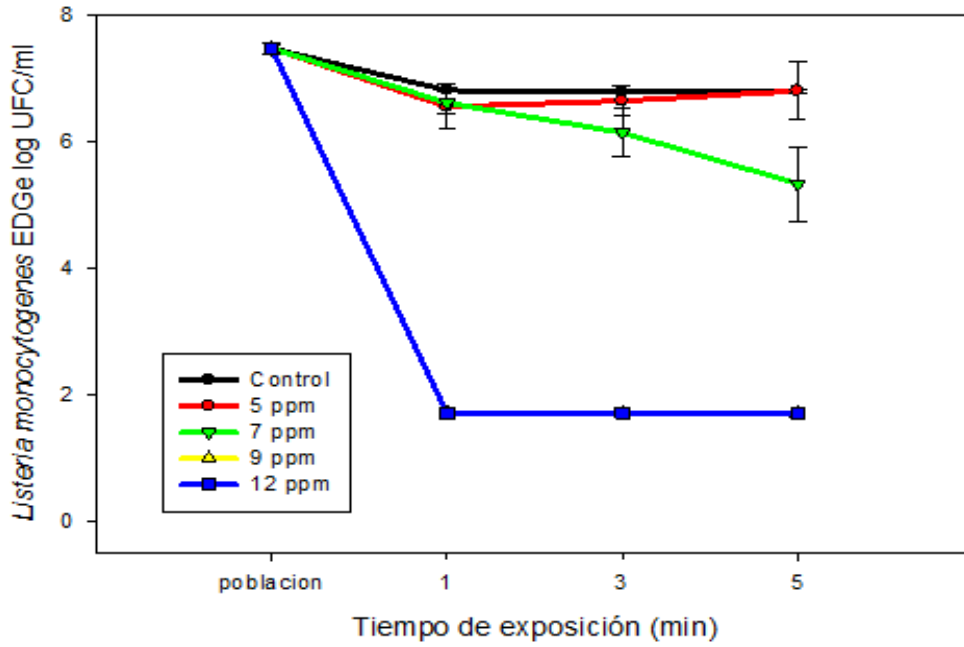


Figura 5. Efecto del AEN sobre células libres de *L. monocytogenes* EDGe a 0, 5, 7, 9 y 12 ppm de cloro libre total en el AEN por 0, 1, 3 y 5 minutos de contacto

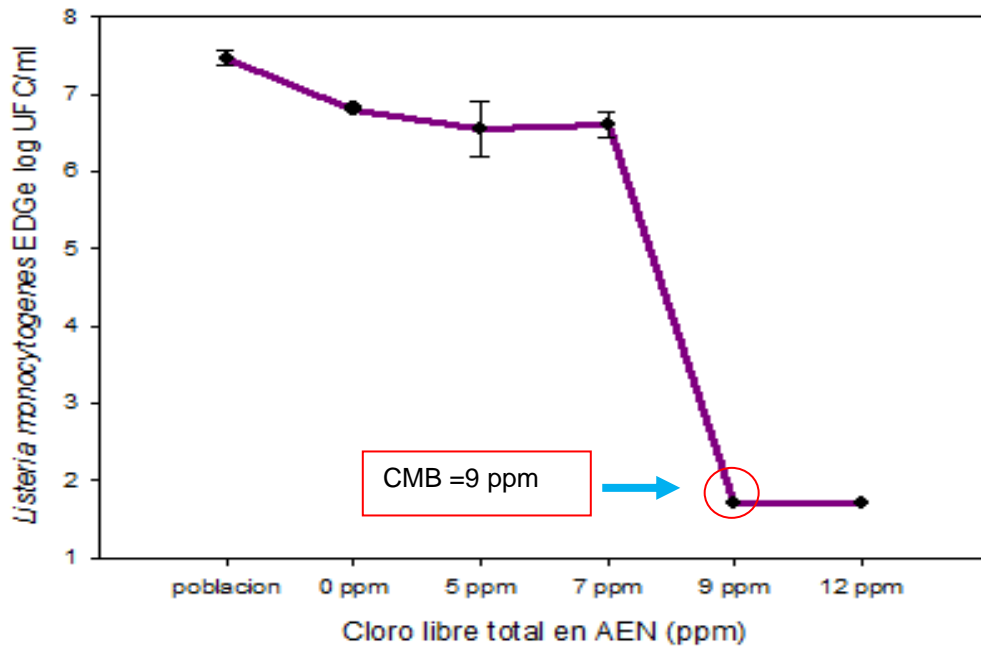


Figura 6. Determinación de CMB a 1 minuto de contacto de *L. monocytogenes* EDGe en forma libre

Al analizar estadísticamente los resultados obtenidos de los recuentos microbianos mostrados en la Figura 5 (utilizando el software JMP), se observó que existe una diferencia significativa sobre los tratamientos realizados ( $p < 0.05$ ).

El Cuadro 4, indica que los tratamientos realizados se ven afectados por la concentración de cloro libre total en el AEN, pero no por el tiempo. La prueba Tukey de las concentraciones indica que el mejor tratamiento corresponde a una concentración de cloro libre total en el AEN de 9 ppm independientemente del tiempo de contacto. Es decir, si se aplica esta concentración por 1 min se obtiene la reducción de la población de las células bacterianas por debajo de su nivel de detección, obteniéndose el mismo efecto si se aplican tiempos de contacto como 3 o 5 minutos de exposición.

Cuadro 4. Análisis estadístico de los tratamientos con AEN sobre células libres de *L. monocytogenes* EDGe.

Parámetros	Prob >F
Concentración	<0.0001
Tiempo	0.5541

## VI.2 Cinética de crecimiento de biopelícula de *Listeria monocytogenes* EDGe

La formación de biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe en superficies de acero inoxidable y vidrio preacondicionadas con L-lisina 0.1mM, se monitorearon mediante recuento microbiano, a lo largo de 5 días (Figura 7). Al inicio del experimento, se inoculó aproximadamente 10 log UFC/cm<sup>2</sup> de células de *L. monocytogenes* EDGe en forma libre para ambos materiales, considerando éste como tiempo cero.

Con respecto a la superficie de vidrio, se aprecia que al cabo de 24 horas, alrededor de 7 log UFC/cm<sup>2</sup> se adhieren a la superficie y a las 48 horas se observa un descenso en la población de alrededor de 1 log UFC/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, después del tercer día la población va en aumento encontrando la mayor población al quinto día adhiriéndose aproximadamente 7 log UFC/cm<sup>2</sup>. Por otro lado, se monitorea de igual manera la cinética de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe sobre acero inoxidable, observándose una tendencia distinta en el crecimiento de las células en este material con respecto al vidrio. Durante los primeros cuatro días del crecimiento de las biopelículas sobre acero inoxidable se aprecia una reducción en la población de alrededor de 5 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, al quinto día cerca de 6 log UFC/cm<sup>2</sup> de células logran adherirse exitosamente a la superficie de acero inoxidable. Por lo tanto, la población recuperada de las células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas no siguió la misma tendencia sobre los dos materiales utilizados en el experimento.

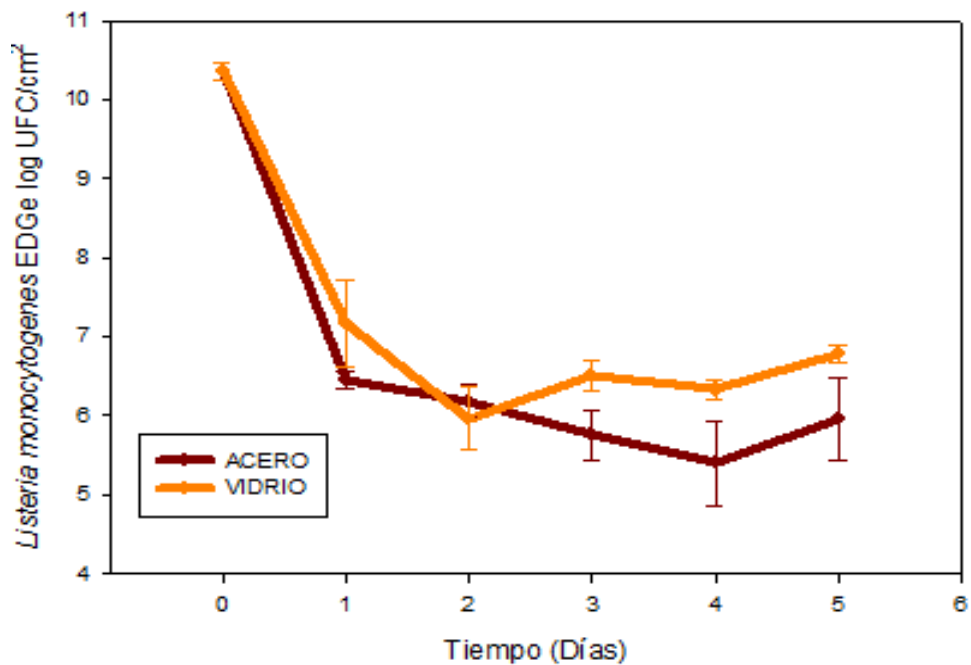


Figura 7. Cinética de crecimiento de células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas sobre superficies de vidrio y acero inoxidable.

En el Cuadro 5 se puede observar que estadísticamente, la cinética de crecimiento de células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas no se ve afectada por el material ( $p>0.05$ ), pero si existe diferencia en la población bacteriana con respecto al tiempo.

Cuadro 5. Análisis estadístico de la cinética de crecimiento de células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas en superficies de vidrio y acero inoxidable.

Parámetros	Prob >F
Tiempo (Días)	0.0003
Material	0.0545

El análisis de los resultados con la prueba Tukey con respecto a la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe indican que no existen diferencias significativas entre las poblaciones bacterianas del primer al quinto día en ambos materiales, pero el inóculo inicial que son células libres (tiempo 0) es diferente a la población en los días posteriores.

Complementando las técnicas microbiológicas, a lo largo de 5 días se observó la formación de las biopelículas mediante la visualización con microscopía de fluorescencia para ambos materiales y luz blanca para la superficie de vidrio (Figuras 8 y 9). Gracias a las características de bioluminiscencia del microorganismo modelo, se logró apreciar las SPE y las zonas de mayor adhesión del microorganismo a la superficie. Se observa en la Figura 8, que al primer día la adhesión las células se localizan principalmente en las fisuras del acero inoxidable, y durante los días posteriores se observa el crecimiento de las microcolonias debido a una mayor respuesta de bioluminiscencia y la producción de las SPE que observa aproximadamente en la totalidad de la superficie.

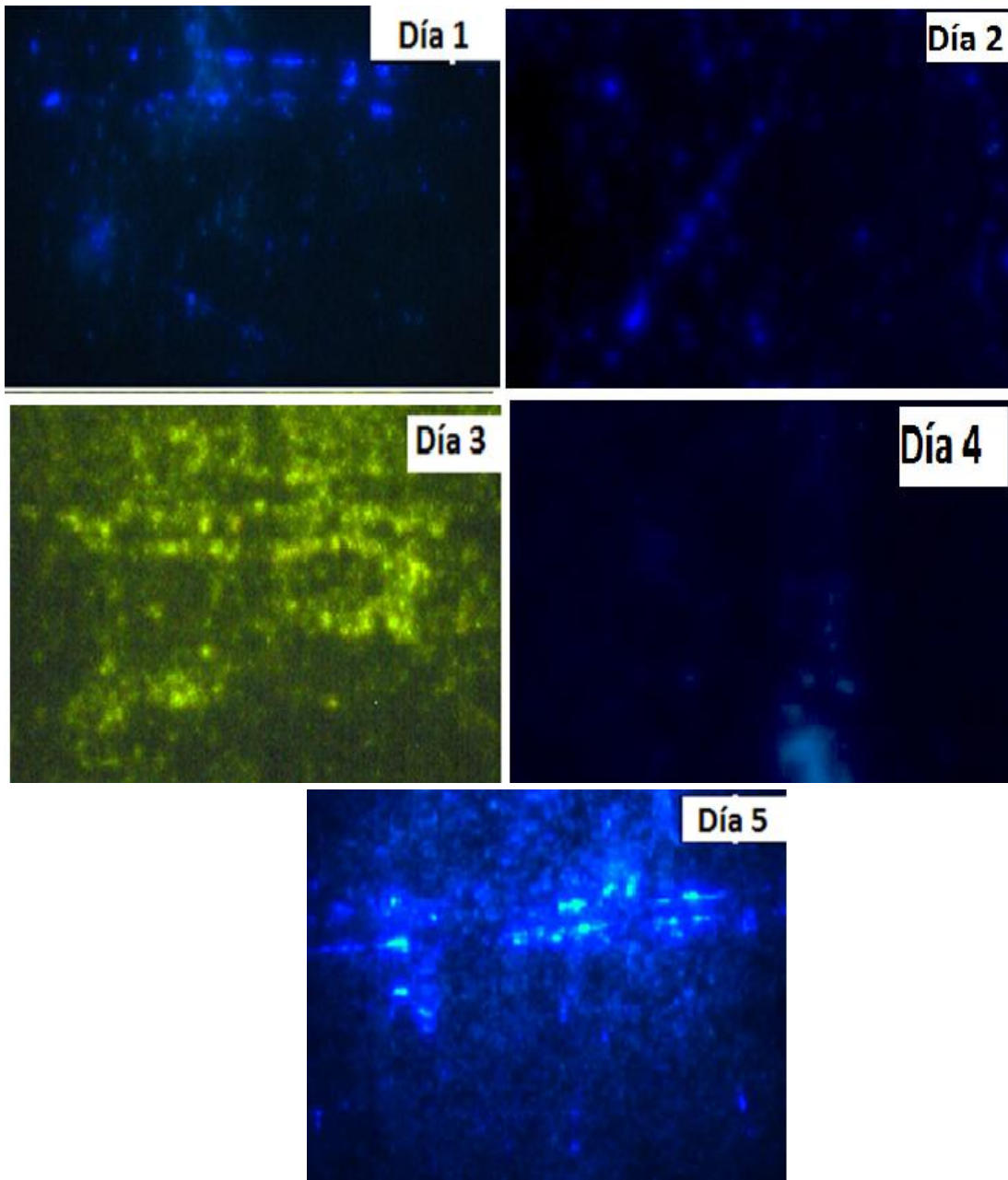


Figura 8. Visualización con microscopio de fluorescencia de la cinética de crecimiento de biopelícula de *L. monocytogenes* EDGe sobre superficies de acero inoxidable. Imagen observada con objetivo de 40x y filtro DAPI.



Por otro lado, en la Figura 9 se observa la adhesión de *L. monocytogenes* EDGe sobre toda la superficie del vidrio desde el primer día, en el tercer día las células de *L. monocytogenes* se agrupan en microcolonias seguido de su crecimiento y al quinto día se logra apreciar las sustancias poliméricas extracelulares en las que se encuentran embebidas las células visualizándose zonas opacas.

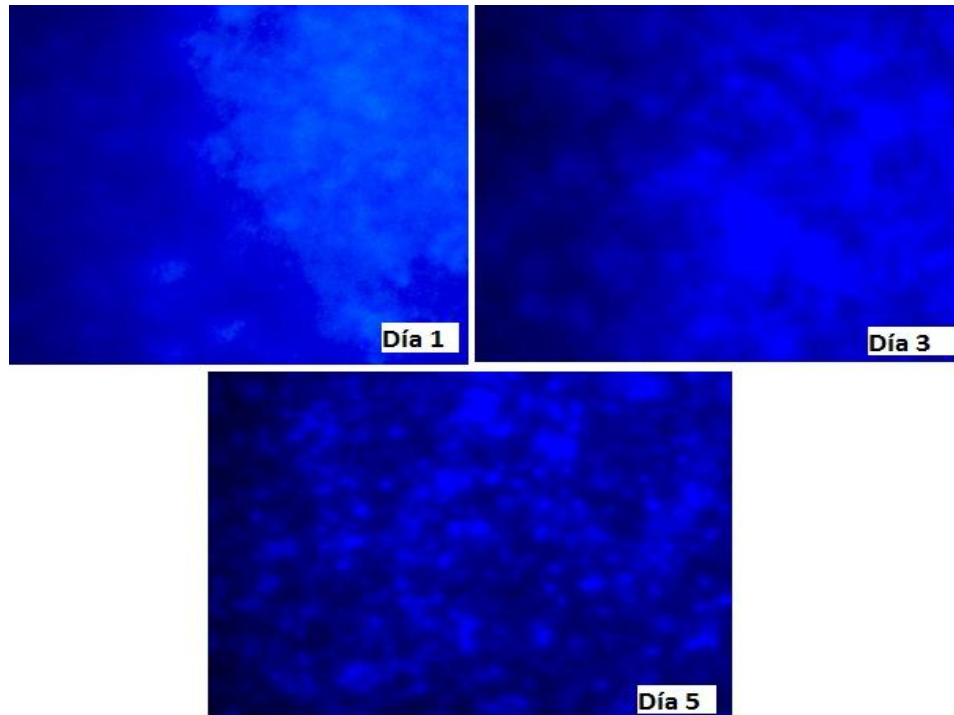


Figura 9. Visualización con microscopio de fluorescencia de la cinética de crecimiento de células de *L. monocytogenes* EDGe sobre superficies de vidrio.

Imagen observada con objetivo de 40x y con filtro DAPI.

Adicionalmente, para la superficie de vidrio, se realizó una tinción Gram, para la visualización de la formación de la biopelícula de *L. monocytogenes* EDGe a lo largo de 5 días. La Figura 10 muestra la adhesión de las células en el día 1 y los días posteriores se observa la agregación del microorganismo formando colonias y su continuo crecimiento, además también se logra apreciar las SPE en el cuarto y quinto día.

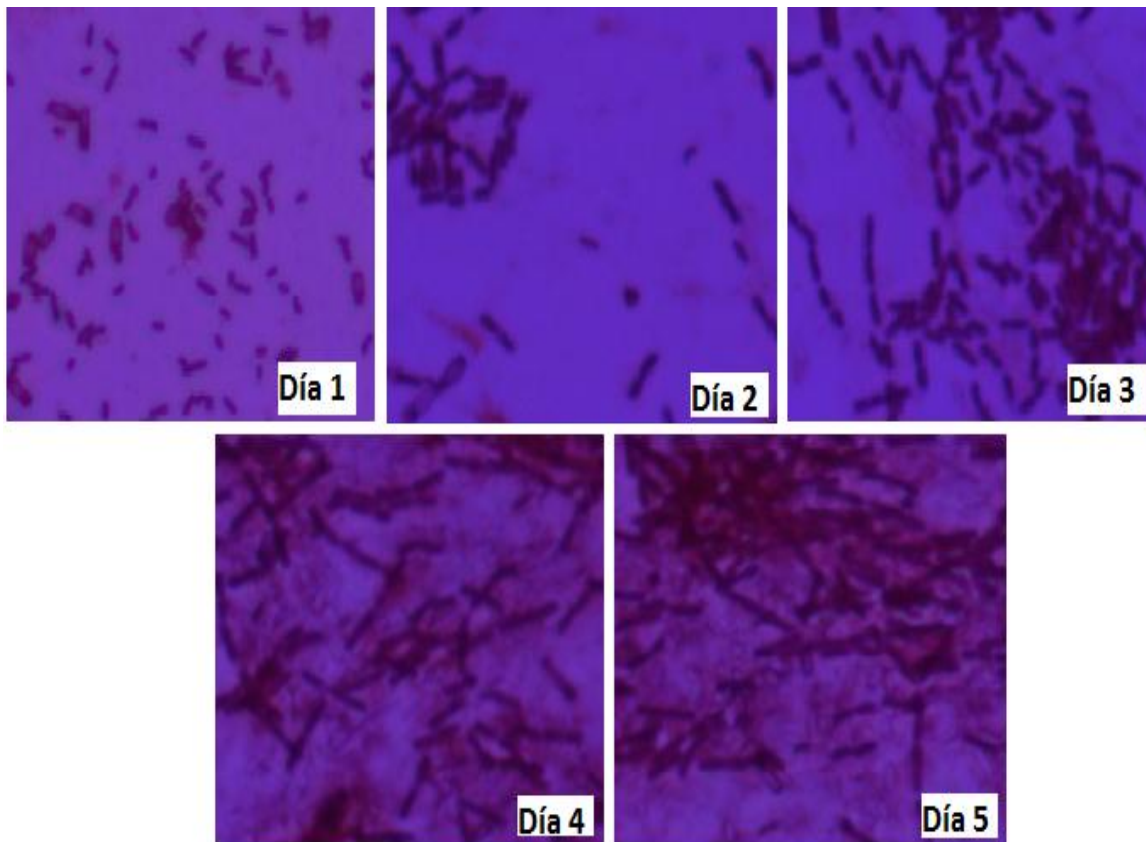


Figura 10. Visualización con microscopio óptico de crecimiento de células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelícula en vidrio mediante tinción Gram.

### VI.3 Efecto del agua electrolizada neutra (AEN) sobre biopelículas.

Para la evaluación del efecto del agua electrolizada sobre las células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas, se utilizó una concentración de cloro libre total en el AEN mayor a la utilizada en los ensayos realizados con células libres. Considerando que estudios anteriores reportan una mayor resistencia a los desinfectantes por parte de las células en biopelícula en comparación con el efecto sobre células libres. Para este estudio, se utilizó de AEN baja en sales (Desy®-BM) con una concentración de cloro libre total (especies oxidantes) de 234 mg/L, pH 6.5-7.5 y REDOX de 800-1000 mV, y agua destilada grado (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) como tratamiento control.

Con respecto a los tratamientos con agua electrolizada neutra baja en sales (0.5% NaCl) a los que fueron sometidos las células de *Listeria monocytogenes* EDGe en biopelícula sobre acero inoxidable se observan en la Figura 11.

Partiendo de una población en biopelícula de 5 días, con una población de 6 log, la característica de resistencia es evidente al observar los resultados obtenidos. Se observa que la población aún en el control (0 ppm de cloro libre total) a distintos tiempos (15, 20, 25 y 30 minutos), se reduce aproximadamente 1 log. Por otro lado a concentraciones de 28, 30 y 37 ppm de cloro libre total a distintos tiempos (15, 20, 25 y 30 minutos) se presenta un efecto bacteriostático, posiblemente las células adquieren resistencia al tratamiento recibido y aquellas células sobrevivientes se multiplicarán nuevamente. A una concentración de 28 ppm de cloro libre total por un tiempo de contacto con la superficie de acero inoxidable de 15 minutos se observa una disminución de 4 log en la población de las biopelículas; sin embargo, después de 20 minutos de contacto con el AEN se observa un continuo aumento en la población de la biopelícula alcanzando al final de los 30 minutos una población de 3.8 log.

Tanto a una concentración de 30 y 37 ppm de cloro libre total expuestos a distintos tiempos de contacto se aprecia un efecto similar al descrito anteriormente, reduciéndose 3.8 y 3.7 log respectivamente. Sin embargo, de manera similar con 28 ppm de cloro libre total en el AEN, en 30 minutos de contacto con el AEN, se presenta la recuperación de las células, logrando incrementar la población al finalizar el experimento.

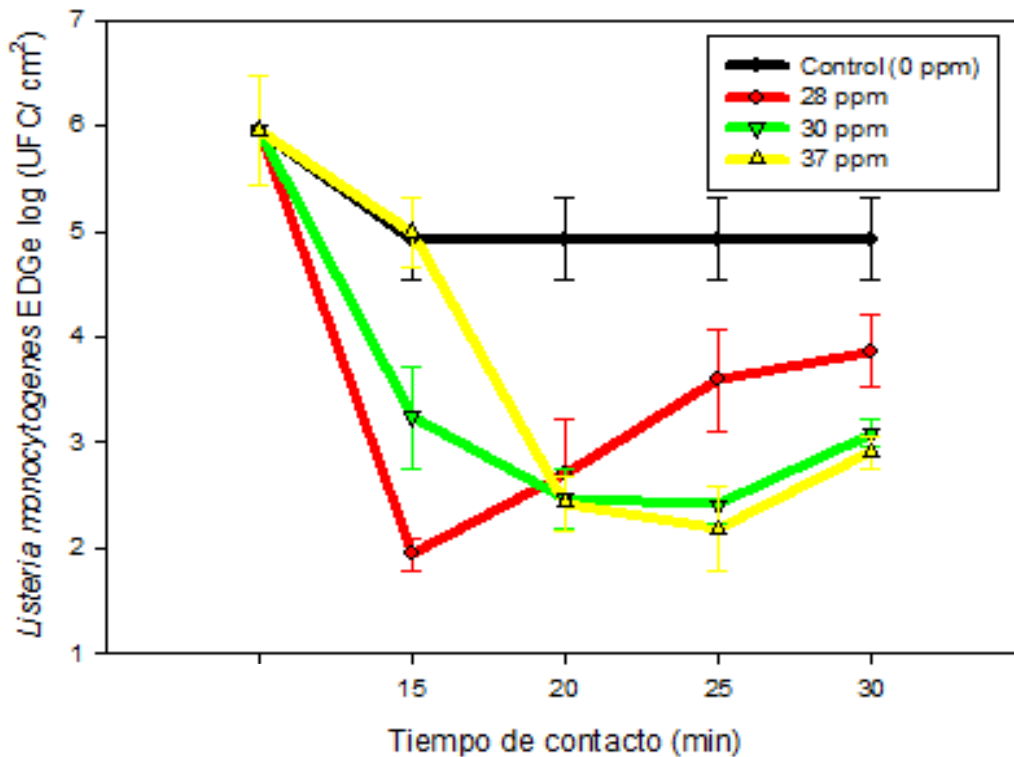


Figura 11. Efecto del AEN sobre células de *Listeria monocytogenes* EDGe en biopelículas en acero inoxidable a 0, 28, 30 y 37 ppm de cloro libre total por 15, 20, 25 y 30 minutos de contacto.

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, se consideró que es necesario aumentar la concentración del cloro libre total en el AEN a las que se expone las células en biopelículas y reducir el tiempo de contacto.

La Figura 12 presenta los resultados para concentraciones de 70 y 117 ppm de cloro libre total a 15 y 20 minutos. Inicialmente se muestra, la reducción de 1 log para el tratamiento control, para ambas concentraciones a 20 minutos de contacto se presenta el efecto bactericida en donde se logra una completa inhibición hasta niveles no detectables en el recuento microbiológico de las células formadoras de biopelículas.

Sin embargo, el análisis de resultados con la prueba Tukey indica que entre concentraciones de 0 a 37 ppm no hay diferencias significativas en la reducción de la población bacteriana, pero si hay diferencias en la reducción de la población cuando las células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas se encuentran a una concentración de 70 y 117 ppm de cloro libre total independientemente del tiempo de contacto.

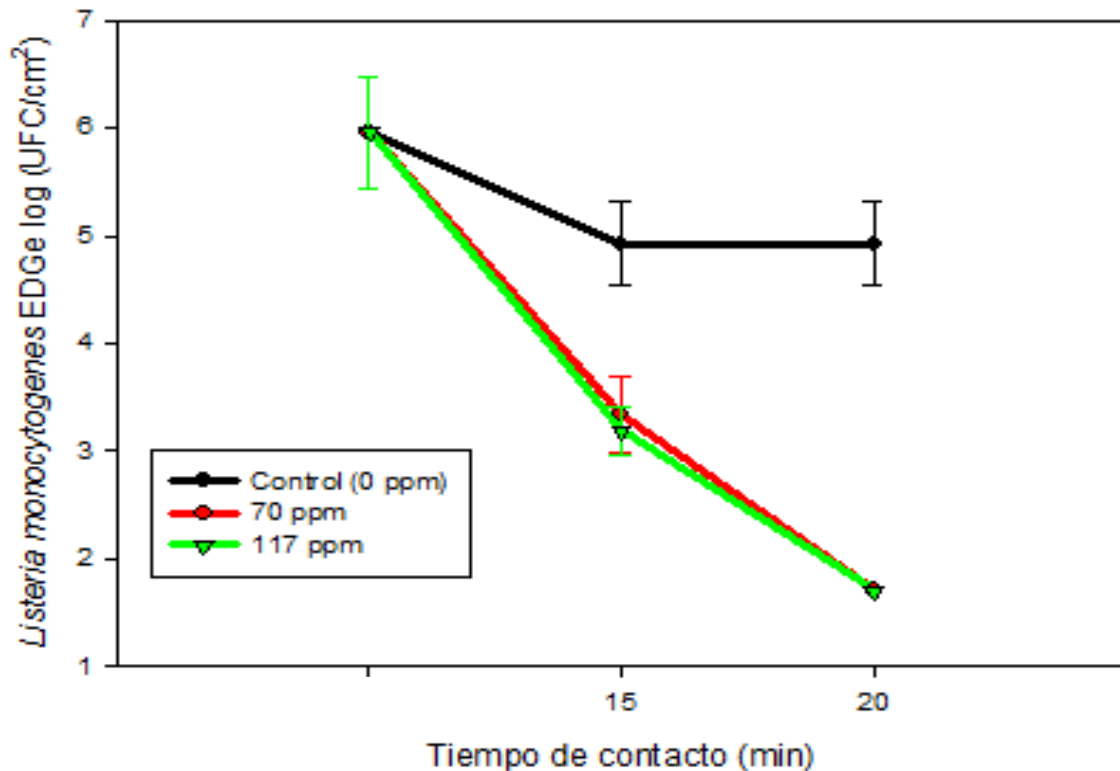


Figura 12. Efecto del AEN sobre células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas en acero inoxidable a 0, 70 y 117 ppm por 15 y 20 minutos de contacto.

Al analizar estadísticamente el efecto de diferentes concentraciones a distintos tiempos de contacto, se aprecia que la concentración del cloro libre total en el AEN juega un papel muy importante en la eliminación de *L. monocytogenes* EDGe formadas en acero inoxidable; sin embargo, el tiempo no resulta significativo en la inactivación de las células bacterianas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis estadístico del efecto del cloro libre en el AEN sobre células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelícula formadas en superficies de acero inoxidable.

Parámetros	Prob >F
Concentración	0.0255
Tiempo	0.1243

Las concentraciones de cloro libre total, se probaron para determinar la CMB en la inactivación de las células formadoras de biopelículas en superficies de acero inoxidable, considerando un tiempo de contacto de 20 minutos para las diferentes concentraciones (0, 28, 30, 37, 70 y 117 ppm de cloro libre total). La Figura 13 muestra que a medida que se aumenta la concentración del cloro libre total se obtiene mayor inhibición de las células en las biopelículas, por lo que se determinó que la CMB es de 70 ppm de cloro libre total logrando disminuir cerca de 6 log de la población de la biopelícula de *L. monocytogenes* EDGe.

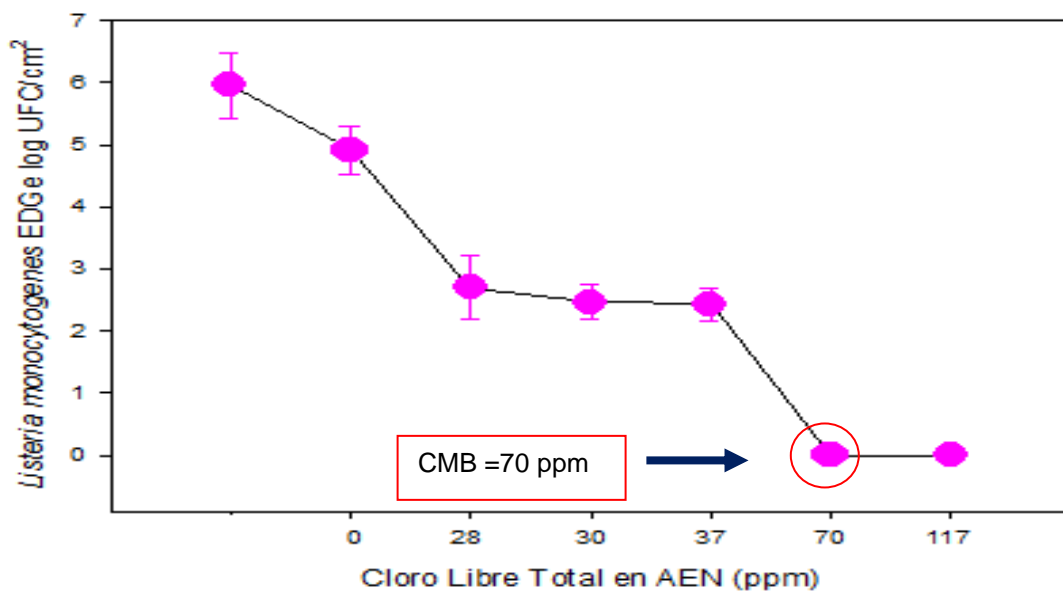


Figura 13. Determinación de CMB a 20 minutos de contacto sobre células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelícula en acero inoxidable

De igual forma, se complementó el estudio con la visualización del efecto del cloro libre total en el AEN sobre las biopelículas (Figura 14) en donde se observa que a medida que se aumenta la concentración del cloro libre total la bioluminiscencia de las células en la biopelícula disminuye e incluso se aprecia el desprendimiento de las sustancias poliméricas extracelulares en las que se presume que se encuentran embebidas las células, por lo cual se observan regiones oscuras.

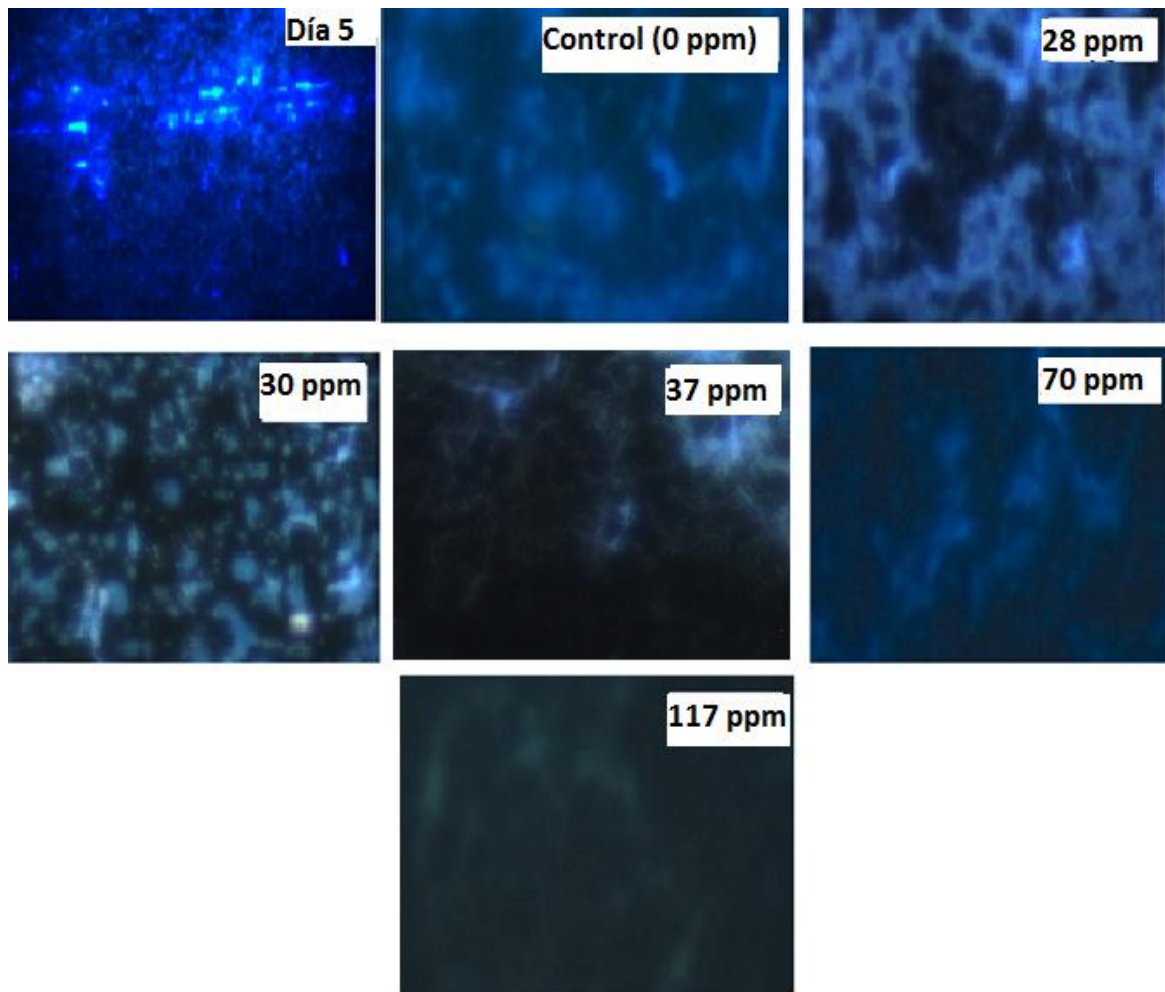


Figura 14. Visualización del efecto del cloro libre total en el AEN sobre células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas en acero inoxidable.

Con respecto a los tratamientos con el AEN sobre células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas formadas en superficies de vidrio, se tomó en cuenta la CMB encontrada para acero inoxidable para verificar si la concentración encontrada era la adecuada para la inactivación de células en biopelículas en las superficies de vidrio. En la Figura 15 se presentan los resultados obtenidos en los recuentos microbiológicos, en la que se aprecia que una concentración de 70 ppm de cloro libre total por 20 minutos logra disminuir la población inicial en alrededor de 10 log UFC/cm<sup>2</sup> hasta niveles no detectables, pues se reduce la población aproximadamente en 6 Log de la población original.

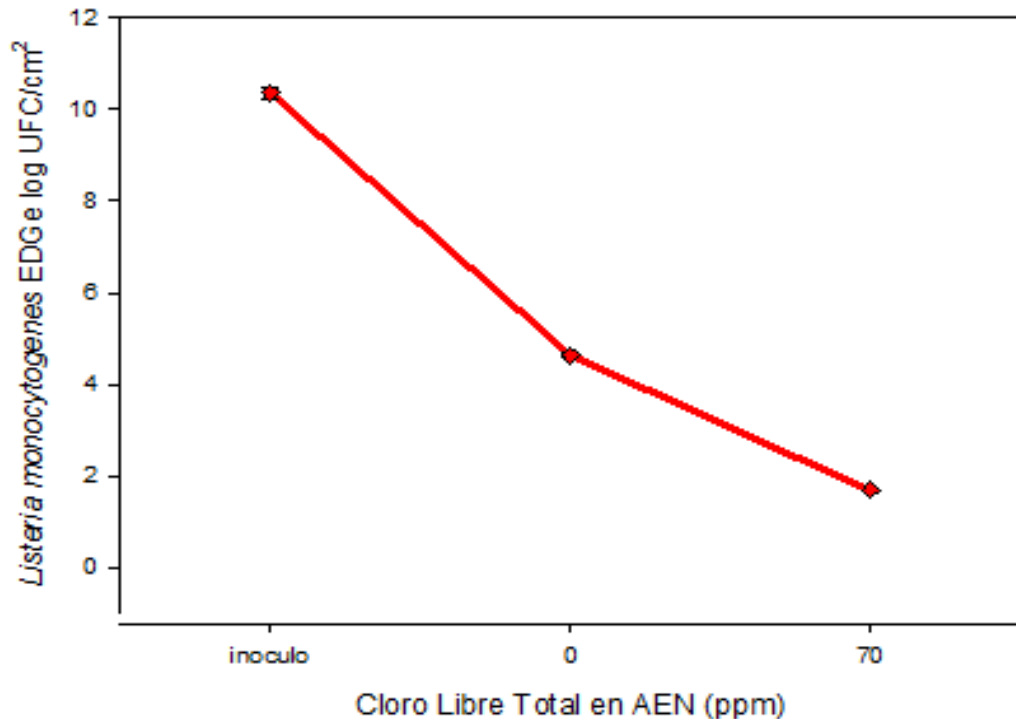


Figura 15. Efecto del AEN sobre células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelículas en vidrio.

En la visualización con microscopía de fluorescencia se logró observar el efecto del AEN sobre biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe en vidrio. En la Figura 16 se



pudo observar que el tratamiento con AEN a una concentración de 70 ppm de cloro libre total logró eliminar las células de *L. monocytogenes* en la biopelícula y removió las SPE de la superficie de acero inoxidable, por lo que se visualizan regiones oscuras. Las células que fueron inactivadas perdieron su bioluminiscencia.

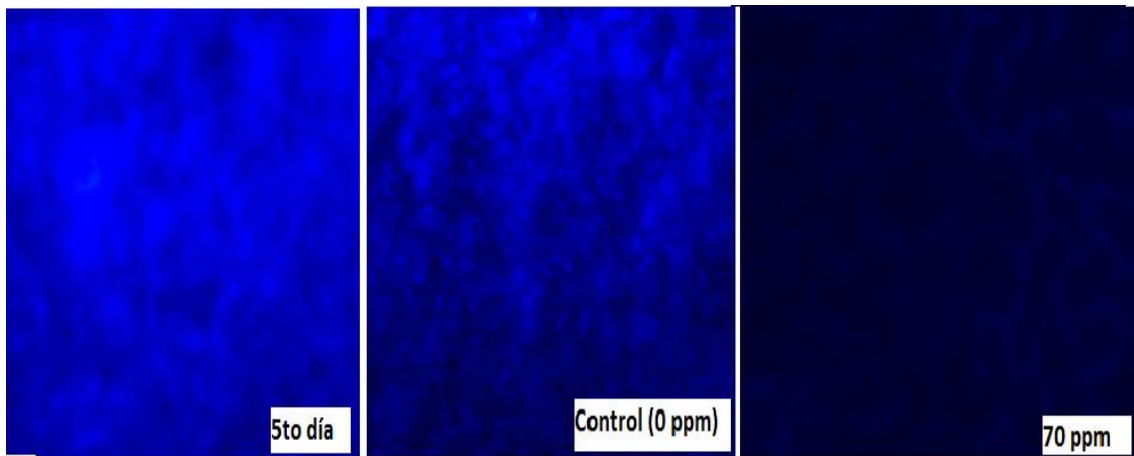


Figura 16. Visualización con microscopía de fluorescencia con filtro DAPI del efecto del AEN sobre células de *L. monocytogenes* EDGe en biopelícula en vidrio.

Anteriormente se mencionó que en este estudio se utilizó AEN baja en sales (Desy®-BM, 0.5% NaCl) con el propósito de compararla con el AEN (Desy®, 5% NaCl) con una concentración de oxidantes de 500 ppm, pH 6.5 a 7.5 y ORP de +800 hasta +1000 mV, en la inactivación de biopelículas.

Los resultados presentados en el Cuadro 7 muestran claramente que para el tratamiento con AEN (5% NaCl) sobre células libres se requiere mayor concentración de cloro libre total (30 ppm), pero el tiempo para lograr inactivarlas se reduce (30 s) y para obtener el mismo resultado utilizando AEN baja en sales se requiere una menor concentración de cloro libre total se necesita exponer las células bacterianas el doble del tiempo.

Cuadro 7. Comparación entre las CMB de AEN (5%) y AEN baja en sales (0.5%) para la inactivación de células libres y en biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe y *L. monocytogenes* Scott A.

	Células libres		Biopelículas	
	Concentración de cloro libre total en AEN (ppm)	Tiempo de exposición (min)	Concentración de cloro libre total en AEN (ppm)	Tiempo de exposición (min)
<i>L. monocytogenes</i> Scott A (Desy®)	30	0.5	65	10
<i>L. monocytogenes</i> EDGe (Desy®-BM)	9	1	70	20

Ambos tratamientos cumplen lo requerido para considerar a el AEN como agente sanitizante de acuerdo a la NOM-120-SSA1-1994.

Observando los resultados, es evidente que las biopelículas son más resistentes al AEN que las células libres debido a que éstas se encuentran expuestas a las especies oxidantes presentes en el agente sanitizante, en el Cuadro 7 se observa que para inactivar las biopelículas de *Listeria* se requiere de menor concentración de cloro libre total en el AEN y de tiempo, pues se necesitaron 65 ppm de cloro libre total por 10 minutos para eliminar las células bacterianas, para el caso del AEN baja en sales se requirió aumentar la concentración a 70 ppm y también del tiempo (20 min) para lograr el mismo efecto.

## VII. DISCUSIÓN

La contaminación cruzada vía superficies inertes es un factor de vital importancia en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) y representa un gran riesgo para la industria alimenticia. Los microorganismos patógenos pueden dispersarse fácilmente, contaminar alimentos y otras superficies, y varios microorganismos tienen la capacidad para adherirse a la superficie encontradas en las líneas de producción de los alimentos y de esta manera son menos susceptibles a los agentes sanitizantes (Deza y col., 2005; Guentzel y col., 2007). Uno de esos microorganismos patógenos capaces de formar biopelículas es *L. monocytogenes* un microorganismo de gran importancia en la industria de alimentos y su presencia en las plantas procesadoras, esta asociada generalmente como una importante fuente de re-contaminación en los alimentos y especialmente en las superficies (Chavant, 2004).

Debido a estas razones, la limpieza y sanitización son elementos importantes en las prácticas de higiene. Sin embargo, el uso de compuestos clorados causa corrosión en los equipos, son irritantes y pueden formar compuestos potencialmente tóxicos (trihalometanos). En respuesta a los problemas relacionados con la seguridad alimentaria se han desarrollado nuevos métodos de sanitización, para prevenir la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos y en las superficies con las que se encuentran en contacto los alimentos. Uno de estos nuevos métodos es el agua electrolizada, la cual está ganando popularidad como sanitizante en la industria de los alimentos para reducir o eliminar la población bacteriana de las superficies (Hricova, 2008).

La formación de una biopelícula ocurre en cinco etapas. En la primera etapa, las células bacterianas se adhieren a la superficie usando fuerzas de Van Der Waals, en la etapa dos, las células se van fijando entre ellas produciendo un compuesto adhesivo llamado SPE. En la etapa tres, las microcolonias se forman y la

biopelícula empieza a madurar. La etapa cuatro envuelve más maduración de la biopelícula y la formación de una estructura tridimensional. Finalmente, la etapa cinco involucra la dispersión de las células (Watnick y Kolter, 2000).

La formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EDGe muestran que en la superficie de vidrio hay una mayor adhesión, mayor crecimiento de células y formación de biopelícula, en comparación con el acero inoxidable (Figura 7). Al inocular en ambas superficies cerca de 10 log, se puede observar que en el caso del vidrio, durante los primeros dos días solamente se adhirieron 6 log, y en el tercer y cuarto día, la población aumentó, pero no fue sino hasta el quinto día que se alcanzó la máxima población de 6.79 log. Por otro lado, en el acero inoxidable se observó, que durante los primero cuatro días, la población va disminuyendo hasta aproximadamente 5 log y al quinto día la población aumenta ligeramente, pues se alcanza una población de 5.96 log.

En un estudio similar realizado por Lomander y col., en el 2004, en el que evaluaron la formación de una biopelícula formada por *E. coli* utilizando como superficies acero inoxidable rugoso y liso, se observó que el acero inoxidable rugoso era más vulnerable a la adhesión de la bacteria que el material liso debido a su topografía, pues las estrías presentes en el acero inoxidable rugoso ofrecieron refugio y protección a las bacterias. Este grupo observó que la formación de la biopelícula iniciaba después de 6 horas, debido a que antes de este tiempo, las células bacterianas empiezan a adherirse a la superficie, inician la formación de la biopelícula, pero también algunas se desprenden. Posteriormente, hay un crecimiento de la biopelícula hasta que ésta alcanza 24 horas de edad, alcanzando un estado de equilibrio entre el desprendimiento y el crecimiento. Chmielewski y Frank (2003) observaron que los defectos presentes en las superficies se encuentran asociados con el incremento en la adhesión bacteriana.

En nuestro estudio, cabe mencionar que tal vez no es posible recuperar todas las células en ambas superficies, en especial debido a la presencia de estrías en la superficie del acero inoxidable.

Van Haecke y col. (1990) observaron que las bacterias prefieren adherirse y formar una biopelícula en las grietas de una superficie. Vaid y col. (2010), realizaron un estudio de inactivación de biopelículas de *L. monocytogenes* sobre una superficie de vidrio, el método que usaron para la recuperación de células fue mecánico mediante agitación (vortex) en una solución neutralizante, posteriormente, se retiraba cuidadosamente la superficie de vidrio y la colocaban en una caja Petri y la cubrían con medio agar soya tripticasa y la incubaban a 37 °C por 48 horas. De esta manera, los autores mencionan que lograron contabilizar las células que no fueron recuperadas. Los resultados arrojados en este estudio advierten que el método de agitar las placas de vidrio, pueden dejar en la superficie 0.3-1.2 log UFC/cm<sup>2</sup>. Por otro lado, Chavant y col. (2004) lograron recuperar 4.3x10<sup>6</sup> UFC/cm<sup>2</sup> en una superficie de acero inoxidable después de 7 días de incubación usando el método de sonicación.

Por lo tanto, basados en estos reportes es posible que los métodos convencionalmente usados para la remoción de células no sean capaces de recuperar todas las células de biopelículas de las superficies, de manera similar sucede lo mismo antes y después de algún tratamiento con sanitizante. Existen numerosos métodos para la cuantificación de células adheridas a una superficie, incluyendo la microscopía, la sonicación, el despredimiento de células mediante perlas de vidrio o por frotación con hisopo y la elección del método depende del tiempo, del costo del método y la facilidad del mismo.

El desarrollo rápido de las biopelículas puede deberse a la limitación de nutrientes que permite aumentar su formación, inducida por la presencia de enlaces irreversibles entre las bacterias. La reducción de la biopelícula puede deberse al

desprendimiento de células en su última etapa por la posible debilitación de la estructura debido a la limitación de oxígeno en la parte profunda de la biopelícula.

Las visualizaciones de biopelículas de *L.monocytogenes* EDGe sobre acero inoxidable y vidrio (Figuras 8 y 9) revelan al cabo de 24 horas, las células bacterianas se encontraban adheridas a la superficie de ambos materiales y que en los días posteriores las bacterias crecían, formando micro-colonias y al finalizar el periodo de incubación de 5 días, se observó la producción de la SPE. Sin embargo, en el acero inoxidable, el crecimiento microbiano se localiza primordialmente en las grietas o fisuras que presentaba, comprobando de esta manera lo mencionado por el estudio de Van Haecke (1990).

De acuerdo con Hood y Zottola (1997), la formación de una biopelícula se encuentra influenciada por varios factores, entre ellos la actividad metabólica de la bacteria, la fase de crecimiento, el pH, los nutrientes, la población inicial que se adhiere a la superficie, la topografía y el tiempo de contacto entre las células y el sustrato. Por lo que se asume que las diferencias observadas en la cinética de crecimiento de las biopelículas en ambas superficies en nuestro estudio, puede deberse a uno o varios de los factores anteriormente mencionados.

Para complementar las visualizaciones con el microscopio, las placas de vidrio también se observaron con un microscopio de luz blanca, mediante tinción con cristal violeta. En la Figura 10, se logra apreciar desde el día 1 la adhesión de las células y su crecimiento, la formación de las microcolonias y hasta el día 5 se aprecian una estructura muy organizada que se mantiene unida por las SPE. Para la superficie de vidrio se observa un mayor crecimiento en comparación con el acero inoxidable, esto puede deberse a la topografía de cada material, de acuerdo con los resultados obtenidos por Lomander (2004), los microorganismos pueden alojarse entre las estrías y ser protegidos por éstas, mientras que en el vidrio, una

superficie que casi no presenta defectos y es más lisa, pueden observarse con mayor facilidad las bacterias adheridas.

Los experimentos realizados tanto en células en forma libre y en células en forma de biopelícula tuvieron como objetivo investigar las diferencias en la susceptibilidad al tratamiento realizado con agua electrolizada neutra.

Daved y O'Toole (2000) reportan que debido a que la biopelícula brinda características especiales a las bacterias que se encuentran dentro de ella, un microorganismo asociado a ésta es 100 a 1000 veces más resistente a los desinfectantes que las formas libres.

En general, las bacterias adheridas son menos sensibles a los agentes antimicrobianos que las bacterias en suspensión, por lo que con nuestro estudio se estudiaron tratamientos con diferentes concentraciones de cloro libre total en AEN (0, 5, 7, 9 y 12 ppm) por 0, 1, 3 y 5 minutos de tiempo de contacto para poder determinar la CMB. Los resultados obtenidos y mostrados en la Figura 5 indican que a concentraciones de 5 y 7 ppm de cloro libre total a 1, 3 y 5 minutos de exposición presentan un efecto bacteriostático en las células libres de *L. monocytogenes* EDGe, lo que sugiere que la exposición a los diferentes tiempos y a las dosis antes mencionadas no causan la muerte de los microorganismo pero inhiben su crecimiento. Después de finalizar el tratamiento con el AEN, se colocaron en 9 ml de buffer neutralizante para neutralizar el cloro residual, de esta manera, es posible que los microorganismos sobrevivientes al tratamiento puedan recuperarse y vuelvan a crecer en el medio. En un estudio realizado por Fux y col. (2005) demostraron que las bacterias se adaptan rápidamente al estrés del medio logrando adaptarse a dichas condiciones.

Por otro lado, también se observa en la Figura 5, que al aumentar la concentración del agente antimicrobiano (AEN) a 9 y 12 ppm de cloro libre total se obtiene una respuesta distinta en todos los tiempos ensayados pues se presenta un efecto

bacteriocida, causando la muerte de las células bacterianas. De esta manera se determinó que la CMB se encuentra a 9 ppm de cloro libre total a un tiempo de exposición de 1 minuto (Figura 6). Debido a que las bacterias en forma libre en comparación con las biopelículas no se encuentran protegidas por la SPE, éstas se encuentran más expuestas a las sustancias oxidantes presentes en el AEN (HClO, ClO<sup>-</sup>, ClO<sub>2</sub> y O<sub>3</sub>).

En el 2005, Deza y col., realizaron un estudio similar de inactivación de *L. monocytogenes*, *E. coli* entre otros microorganismos, utilizando como agente antimicrobiano AEN preparada a partir de una solución de NaCl 25% obteniendo una solución con 400 ppm de cloro libre total, se encontró que células en suspensión de *L. monocytogenes* con una población inicial de 7.5 log UFC/ml se logran disminuir hasta niveles no detectables usando 63 ppm de cloro libre total por 5 minutos de exposición. En otro estudio realizado por Issa-Zacharia y col. (2010) usando agua electrolizada ligeramente ácida producida por la electrólisis de una solución diluida de HCl, se obtuvo que a una concentración de 20 ppm durante 5 minutos logra disminuir hasta 1.68 log UFC/cm<sup>2</sup> de una población original de 8 log UFC/cm<sup>2</sup> de *Salmonella* inoculadas en fresas.

Venkitanarayanan y col. (1999), realizaron un estudio sobre células libres evaluando la eficacia del AEA elaborada con una solución de NaCl al 12% en la eliminación de diversos microorganismos en suspensión, entre los que se encontraba *L. monocytogenes*. Usando una población de 8 log, se observó que a una concentración de 79.8 ppm con un tiempo de contacto de 2 minutos ya no se encontraban células viables. El agua electrolizada usada por Venkitanarayanan y col., tenía un pH de 2.48-2.63, un potencial de óxido-reducción de 1158- 1160 mV.

En el 2008, Abadías y col., realizaron un ensayo en células libres con una población inicial de 8 log de *L. innocua*, para su inactivación usaron AEN con una concentración de cloro libre total de 281 ppm, pH de 8.74 y un ORP de 721 mV.



Los resultados indicaron que a una concentración de 48 ppm por 1 minuto de contacto se logra una reducción de más de 5 log UFC/cm<sup>2</sup>.

Park y col (2004) realizaron un estudio sobre una población 8 log UFC/cm<sup>2</sup> de *L. monocytogenes* logrando inactivar completamente las células usando una concentración de 1 ppm de cloro libre total en el AEN en 30 s, el agua usada en este estudio presentaba un pH de 2-4, un ORP de 800-1000 mV y una concentración de 1 a 5 ppm de cloro libre total. Guentzel y col. (2008) evaluaron la efectividad del AEN a una concentración de 4 ppm a 10 minutos de contacto sobre una población inicial de 8 log UFC/cm<sup>2</sup> de *L. monocytogenes* en forma libre logrando inactivar totalmente las células.

Comparando, por un lado nuestros resultados con los estudios de Deza y col. (2005), Issa-Zacharia y col. (2010) y Venkitanarayanan y col. (1999) las concentraciones de cloro libre total en el AEN utilizadas que disminuyeron al menos 5 log UFC/cm<sup>2</sup> de la población inicial del microorganismo son concentraciones muy por encima de la encontrada en este estudio (9 ppm de cloro libre total en el AEN a 1 minuto), las diferencias pueden deberse a las diferentes características de los tipos de agua electrolizada utilizadas.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Guentzel y col. (2008), son similares pues en el estudio usaron 4 ppm de cloro libre total en el AEN por 10 minutos de contacto logrando inactivar por completo el microorganismo y en este trabajo para obtener un efecto similar, se aumentó la dosis del AEN a 9 ppm de cloro libre total y se disminuyó el tiempo a 1 minuto. Nuestros resultados comparados con los de Park y col. (2004), también son similares pues ellos usaron 1 ppm de cloro libre total en el AEN por 30 s logrando inactivar completamente las bacterias; sin embargo, el agua usada en el estudio de Park (2004) es distinta a la nuestra.

La adhesión y la colonización en las superficies conllevan modificaciones importantes en la fisiología de las células permitiendo que sean resistentes al estrés y a varios agentes desinfectantes (Chavant, 2004). Para las bacterias, la habilidad de crecer en las superficies en forma de biopelícula es consecuencia de estrategias de supervivencias adoptadas por muchas especies incluyendo *L. monocytogenes*. Generalmente, las biopelículas bacterianas se encuentran compuestas de comunidades microbianas adheridas a una superficie embebidas en una sustancia polimérica extracelular. Una de las más extraordinarias propiedades de estas comunidades es su aumento en la resistencia a los agentes antimicrobianos (Trémoulet y col., 2002).

Para conocer el efecto del AEN sobre las biopelículas formadas por *Listeria monocytogenes* EDGe en ambos materiales. Las biopelículas de *L. monocytogenes* formadas en la superficie de acero inoxidable se sometieron a un tratamiento a diferentes concentraciones (0, 28, 30, 37, 70 y 117 ppm de cloro libre total en el AEN) a distintos tiempos (15, 20, 25 y 30 minutos). La Figura 11 muestra que para las concentraciones de AEN de 28, 30 y 37 ppm de cloro libre total a los distintos tiempos mencionados con anterioridad hay un efecto bacteriostático, indicando que a las dosis mencionadas anteriormente no causan muerte bacteriana, solo inhiben el crecimiento microbiano, existe diversos factores o características de la biopelícula a los cuales puede atribuírsele este efecto, los cuales son una respuesta al estrés, uno de ellos es su matriz o la SPE con la cual se encuentran agregadas y adheridas a la superficie. La matriz juega un papel importante en la protección de las bacterias contra los agentes antimicrobianos, debido a que retarda la entrada de estos al interior de la biopelícula. Otra razón, es que la tasa de crecimiento de las bacterias dentro de la biopelícula es irregular, además de que la bacterias más superficiales son las más susceptibles a los agentes antimicrobianos permitiendo que las bacterias que se encuentran en las capas más profundas de la biopelícula estén protegidas, la producción de enzimas que degradan las sustancias antimicrobianas, y la falta de nutrientes permiten que las

bacterias se encuentren en un estado metabólico reducido. Además, la facilidad para remover una biopelícula depende en gran manera del tipo de superficie, por ejemplo, la formación de una biopelícula en una superficie con grietas y deterioraciones dificulta su remoción, existe varios estudios que apoyan la conclusión de que las superficies erosionadas son más difíciles de limpiar y sanitizar (Chmielewski y Frank, 2003, Moltz y Martin, 2004, Chavant y col., 2004 Fux y col., 2005).

Pan y col. (2006), demostraron la resistencia de las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* a diferentes agentes sanitizantes, entre los que se incluyen peróxido de hidrógeno, sales cuaternarias de amonio, cloro entre otros, en este estudio se demostró que la resistencia presentada por las biopelículas incrementaba con la densidad celular. Lomander y col. (2004) demostraron que las biopelículas formadas en las grietas o fisuras del acero inoxidable protegen a las bacterias de los agentes antimicrobianos y Vaid y col. (2010), indicaron que la resistencia de las biopelículas incrementaron con la madurez, pues en un estudio realizado por Lee y Frank (1991) encontraron que una biopelícula formada de *L. monocytogenes* de 8 días de edad en acero inoxidable era el doble de resistente al cloro en comparación con una biopelícula de 4 días de edad.

Dado los reportes anteriores, se consideró en nuestro estudio que para lograr la inactivación de las bacterias dentro de la biopelícula, era necesario utilizar tratamientos de AEN a altas concentraciones de cloro libre total, o incrementar el tiempo de contacto. En la Figura 12 se muestra que al aumentar la dosis del AEN a 70 y 117 ppm de cloro libre total y disminuyendo el tiempo de contacto con la superficie a 15 y 20 minutos se obtiene el efecto bactericida en el cual las células bacterianas mueren. En la Figura 13 se observa la determinación de la CMB, la cual se encuentra a una concentración de AEN de 70 ppm de cloro libre total durante 15 minutos.

Con respecto a los tratamientos con el AEN sobre biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe formadas en superficies de vidrio, se tomó en cuenta la CMB encontrada para acero inoxidable para verificar si la concentración encontrada era la adecuada para la inactivación de células en biopelículas sobre esta superficie (Figura 15). Se encontró en los recuentos microbianos que la concentración de AEN de 70 ppm de cloro libre total también era la suficiente para la inactivación de las células en las biopelícula, logrando una reducción hasta niveles no detectables.

Como se mencionó anteriormente, el AEN contiene sustancias oxidantes ( $\text{HClO}$ ,  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{ClO}_2$  y  $\text{O}_3$ ) que dañan y causan la muerte de los microorganismos. Por un lado, el dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) desinfecta por oxidación. Algunos mecanismos sugeridos de la inactivación de bacterias es que reacciona con aminoácidos y con los ácidos grasos libres, bloqueando la síntesis de proteínas e incrementando la permeabilidad de la membrana celular pues reacciona con algunos componentes de ella como las proteínas y los lípidos (Chmielewski y Frank, 2003, Parish y col., 2003, Vaid y col., 2010)

El ozono ( $\text{O}_3$ ) tiene una alta capacidad oxidativa; sin embargo, la inactivación bacteriana por el ozono es un proceso complejo, debido a que el ozono ataca numerosos constituyentes celulares incluyendo proteínas, lípidos insaturados y enzimas respiratorias. En general, se encarga de oxidar ácidos grasos poliinsaturados y glicoproteínas de la membrana, llevando a la pérdida del contenido celular y eventualmente causa la lisis de la célula. Además, oxida los dobles enlaces de los lípidos insaturados y los grupos sulfhidrilo de las enzimas, lo que causa que la actividad normal de la célula se vea interrumpida causando permeabilidad en la célula y sobreviene rápidamente la muerte de la célula (Khadre y col., 2001)

El ácido hipocloroso y el ión hipoclorito causan la oxidación de enzimas sulfhidrilas y de aminoácidos, inhibición de la síntesis de proteínas y rompimiento del ADN (Parish y col., 2003, Chaves y col., 2004)

Se sugiere que la actividad antimicrobiana del AEN se debe a un efecto combinado entre el ORP y los compuestos oxidantes. Por un lado el ORP daña la membrana celular y desactiva los mecanismos de defensa de las bacterias y el HClO penetra en el interior de la célula.

En un estudio realizado por Liu y col. (2006) en el que sumergieron placas de acero inoxidable con biopelículas de *L. monocytogenes* por 5 min en AEA a una concentración de 40 ppm de cloro libre total, un pH de 2.6 y un ORP de 1125 mV lograron reducir la población a 3.73 log/25 cm<sup>2</sup>. Kim y col. (2001), investigaron la resistencia de las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable al AEA (pH de 2.6, ORP de 1160 mV y una concentración de cloro de 56 ppm) y encontraron que un tratamiento de 300s en la superficie de acero inoxidable podía reducir las bacterias de 1.9x10<sup>10</sup> UFC/82.5 cm<sup>2</sup> por debajo de los niveles de detección. Ayebah y col. (2005), inactivaron biopelículas de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable con un tratamiento con AEA en tiempos de contacto de 30 a 120 s logrando reducir la población de 4.3-5.2 log UFC/por chip de su población original.

Deza y col. (2005), utilizaron AEN con una concentración de 60 ppm de cloro libre total en un tratamiento de 5 minutos en una biopelícula de *L. monocytogenes* formadas sobre acero inoxidable y vidrio, con una población inicial de 8 log UFC/50 cm<sup>2</sup> en ambas superficies, logrando reducir la población por más de 6 log UFC/50 cm<sup>2</sup> para ambas superficies.

Las diferencias obtenidas de las concentraciones que fueron eficientes para la desactivación de las biopelículas de *L. monocytogenes* en los estudios anteriores y

el nuestro, pueden deberse a las características del AE utilizada, mientras en los estudios de Liu, Kim y Ayebah usaron agua electrolizada ácida, en nuestro estudios y Deza se usó AEN, que no sólo difieren en el pH, sino también en el ORP y concentración de cloro libre total y el equipo utilizado para su generación. Los resultados anteriores junto con los reportados en otros estudios indican claramente la actividad antimicrobiana del AE.

El estudio del efecto del AEN sobre las biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe formadas sobre acero inoxidable y vidrio se complementaron con la visualización microscópica. Las Figuras 14 y 16 se observa el efecto del AEN sobre acero inoxidable y vidrio respectivamente, en el caso del acero inoxidable, se logra observar que a medida que se aumenta la concentración de cloro libre total en el AEN, la biopelícula se va dañando cada vez más y las bacterias pierden bioluminiscencia. A fin de eliminar las células en la biopelícula, el AEN debe penetrar la estructura. En la Figura 14 se observa claramente no solo el desprendimiento de células a medida que se aumenta la concentración, sino que en 60, 65 y 80 ppm, se aprecia el desprendimiento de SPE. Al alcanzar la CMB (70 ppm) ya no se observa la estructura de la biopelícula. De igual manera, se logra apreciar en la Figura 16 que al llegar a 70 ppm de cloro libre total, las células bacterianas lograron eliminarse del material al igual que la SPE, pues con el tratamiento se logra desprender las sustancias adhesivas que protegen a las bacterias y en la que se presume que se encuentran embebidas. Es importante asegurar que el tratamiento con el AEN no haya dejado residuos de SPE o de cualquier material orgánico, que pueden servir como sitios de adhesión para otras bacterias lo que resultará en una rápida formación de biopelícula (Agle, 2007).

También cabe resaltar que las diferencias que se observan en la Tabla 5, se deben a que los microorganismos modelos que se utilizaron para desarrollar el estudio pertenecen al mismo género y especie, se trata de dos genotipos de cepa distintos. De acuerdo con Agle (2007), el principal “pegamento” para que las bacterias se

adhieran a la superficie es una mezcla de polisacáridos conocido como SPE que son secretadas por las mismas bacterias que conforman la biopelícula. Los diferentes tipos de SPE que son secretados varía dependiendo del microorganismo y la producción de este polisacárido es resultado de una respuesta al estrés y depende en gran medida de los nutrientes presentes en el medio. Por ejemplo, el componente principal en la SPE producida por las biopelículas de *P. aeruginosa* es el alginato.

El uso del acero inoxidable en este estudio se debe a que es el material más usado en la industria de los alimentos debido a que se ha reportado que es el material ideal debido a sus propiedades químicas y físicas que lo hacen estable a varias temperaturas de procesamiento de alimentos, es fácil de limpiar y tiene una alta resistencia a la corrosión.

El AEN usada en el presente estudio, es una agua electrolizada baja en sales (0.5%). Los resultados obtenidos con un estudio similar realizados por Kiura y col. (2002) advierten que debido a que el AEN podía ocasionar corrosión en equipo, por lo que se implementó el uso de AEN baja en sales. Además indicaron que recientemente para minimizar la actividad corrosiva y su potencial toxicidad del AE, el AE baja en sales preparada por la electrólisis de una solución con una baja concentración de NaCl y se ha confirmado ser efectiva contra microorganismos patógenos. Los resultados obtenidos de Kiura y col. (2002) indican que la concentración de cloro libre total incrementa con el tiempo de electrólisis y con la concentración de NaCl, además también se incrementa el ORP y decrece el pH. Al-Haq y col. (2005), sugirieron que la concentración de cloro libre total en el AE se encuentra influenciada por la cantidad de NaCl adicionada.

La concentración de sal puede causar corrosión de los equipos, mientras que la aquí reportada parte de 0.5 % NaCl lo cual minimiza dicho efecto, aunque la dosis y el tiempo de contacto deben aumentarse (70 ppm de cloro libre total por 20 min).

## VIII. CONCLUSIONES

Del estudio de la cinética de crecimiento de biopelículas de *L.monocytogenes* EDGe sobre superficies de vidrio y acero inoxidable, se desprende que la adhesión alcanzada por este microorganismo fue mayor en vidrio alcanzando una población de 6.79 log UFC/cm<sup>2</sup> comparada con la observada en acero.

El agua electrolizada neutra baja en sales mostró un efecto bactericida sobre las células libres de *L.monocytogenes* EDGe logrando disminuir su población por debajo del nivel de detección cuando se utiliza a una concentración de AEN de 9 ppm de cloro libre total durante 1 minuto.

Una concentración de 70 ppm de cloro libre total en el AEN baja en sales logro reducciones mayores a 5 log UFC/cm<sup>2</sup> en células en forma de biopelícula de *L. monocytogenes* EDGe en superficies de acero inoxidable y vidrio a tiempos de exposición de 20 minutos.

Las células en biopelículas de *L. monocytogenes* EDGe resultaron ser más resistentes a la acción del AEN que las células libres al exponerlas al agua electrolizada neutra.

El uso de técnicas microscópicas permitió el estudio de la formación de biopelículas en diferentes superficies y visualizar el efecto del AEN sobre la estructura de éstas.

El uso de una cepa bioluminiscente de *L. monocytogenes* permite usar técnicas microscópicas rápidas, no destructivas para detectar biopelículas en el ambiente del procesamiento de alimentos.



Este trabajo sirve de pauta a futuras investigaciones para evaluar la eficiencia del AEN como un desinfectante para frutas y vegetales, así como también evaluar el efecto de este agente antimicrobiano sobre la calidad de los alimentos. Utilizando el mismo microorganismo bioluminiscente usado para este trabajo facilitará la visualización de las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* sobre el tejido.

Sería interesante estudiar, a través de técnicas moleculares, si al momento de poner en contacto las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* a un tratamiento con AEN, el gen pPL2*lux* se pierde o bien si se encuentra presente en el ADN pero no se expresa.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

**Abadias**, M., Usall, J., Oliveira, M., Alegre, I., Viñas, I. **2008**. Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally-processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 123: 151-158.

**Agle**, M.E. **2007**. *Biofilms in the food environment*. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists. 3-17

**Al-Haq**, M., Sugiyama, J., Isobe, S. **2005**. Application of electrolyzed water in Agriculture and Food Industries. *Food Science and Technology*. Vol. 11: 135-150.

**Allison**, D., Sutherland, I. **1987**. The role of exopolysaccharide in adhesion of freshwater bacteria. *Journal of General Microbiology*. Vol. 133: 1319-27

**Annous**, B. A., Fratamico, P. M., Smith, J. L., **2009**. Quorum sensin in biofilms; Why they behave the way they do. *Journal of Food Science*. Vol. 74: R24-R37

**Asad**, S., Opal, S. M. **2008**. Bench to bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Critical Care Medicine*. Vol 12: 236

**Ayebah**, B., Hung, Y. C., Kim, C., Frank, J. F. **2006**. Efficacy of Electrolyzed Water in the Inactivation of planktonic and biofilm *Listeria* in the presence of organic matter. *Journal of Food Protection*. Vol. 69: 2143-2150.

**Ayebah**, B., Hung, Y.-C., y Frank, J. F. **2005**. Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. *Journal of Food Protection*. Vol. 68: 1375-1380.

**Bagge**, D., Hjelm, M., Johansen, C., Huber, I., Gram, L. **2001**. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67: 2319-25.

**Barnes**, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R., Chamberlain, A. H. **1999**. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65: 4543-8.

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

- Bialka**, K. L., Demirci, A., Knabel, S. J., Patterson, P. H., Puri, V. M. **2004**. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. *Poultry Science* Vol. 83:2071–2078
- Bishop**, P. L. **1997**. Biofilm structure and kinetics. *Water Science and Technology*. Vol. 36: 287-294.
- Blaschek**, H. P., Wang, H. H. **2007**. Inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms using chemical sanitizers and heat. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists.
- Bos** R, Mei HC, Gold J, Busscher HJ. **2000**. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 189:311-5.
- Bower**, C. K., McGuire, J., Daeschel, M. A. **1996**. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*. Vol. 7: 2-7.
- Briandet**, R., Meylheue, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, M.N. **1999**. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 532833.
- Brock**, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. **1998**. Brock: Biología de los microorganismos. 8ª. Ed. Prentice Hall, Madrid, España: 1064.
- Bron**, P. A., Monk, I. R., Corr, S. C., Hill, C., y Gahan, C. G., **2006**. Novel luciferase reporter system for in vitro and organ-specific monitoring of differential gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72: 2876-2884.
- Brooks**, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A., **2005**. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18ª. Ed. El Manual Moderno, México: 214
- 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., Gaillard-Martinie, Brigitte., Hébraud, M. 2004.** Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. FEMS Microbiology Letters. Vol. 236: 241-248.
- Chaves, G., Medina, I., De Colmenares, B., Mercado, M., Carrascal, A. 2004.** Producción de agua electrolizada para eliminación de microorganismos en lechuga. Universitas Scientiarum Vol. 9: 91-100.
- 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.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. 1999.** Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. Scientific American. Vol. 284: 1318-1322.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. 2001.** Battling Biofilms. Scientific American. Vol. 285: 75-81
- Daved, H. M., O'Toole, G. A. 2000.** Microbiological biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 64: 847-867.
- Deza, M. A., Araujo, M., Garrido, M. J. 2003.** Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. Letters in Applied Microbiology. Vol. 37: 482-487
- Deza, M. A., Araujo, M., Garrido, M. J. 2005.** Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surface by neutral electrolyzed water. Letters in Applied Microbiology. Vol. 40: 341-346.
- Donlan, R.M. 2002.** Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerging Infectious diseases. Vol. 8:881-890.
- Fernández, E.E. 2008.** Microbiología e inocuidad de los alimentos. 2da edición., Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro: 220-225, 235-238
- Frank, J. F. 2000.** Control of biofilm in the food and beverage industry. Industrial Biofouling. Chicester. 205-224.
- Fux, C., Costerton, J., Stewart, P., Stoodley, P. 2005.** Survival strategies of infectious biofilms. Trends in Microbiology. Vol. 13: 34-40.

**Gandhi, M., Chikindas, L. M. 2006.** *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology. Vol. 113: 1-15

**García-Almendárez, B. E., Cann, I. K. O., Martin, S. E., Guerrero, L. I., Regalado, C. 2008.** Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. Food Control. Vol. 19: 670-680.

**Gelinas, P., Goulet, J., Tastayre, G. M., Picard, G. A. 1984.** Effect of temperature and contact time on the activity of 8 disinfectants- a classification. Journal of Food Protection. Vol. 47: 841-7.

**Guentzel, J., Lam, K., Callan, M., Emmons, S., Dunham, L. 2008.** Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surace in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. Food Microbiology. Vol. 25: 36-41.

**Hall- Stoodley, L., Stoodley, P. 2009.** Evolving concepts in biofilm infection. Cellular Microbiology. Vol. 11: 1034-1043.

**Hood, S., Zottola, E. 1997.** Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. International Journal of Food Microbiology. Vol. 37:145-53.

**Hricova, D., Stephan, R., Zweifel, C. 2008.** Electrolized water and its application in the Food Industry. Journal of Food Protection Vol. 71: 1934-1947.

**Hsu, S. Y. 2005.** Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. Journal of Food Engineering 66: 171–176.

**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.

**Issa-Zacharia, A., Kamitani, Y., Muhimbula, H., Iwasaki, K. 2010.** Antimicronial effect of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* on fresh strawberries (*Fragaria* L.). African Journal of Microbiology Research. Vol 4: 2174-2180.

**Khadre, M., Yousef, A., Kim, J. 2001.** Microbiological aspects of Ozone. Applications in Food: A Review. Journal of Food Science. Vol 66: 1242-1252

**Kim, C., Hung Y C., Brackett, R. E., Frank, J. F. 2001.** Inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms by electrolyzed oxidizing water. Journal Food Process Press. Vol. 2: 91-100.

**Kiura, H., Sano, K., Morimatsy, S., Nakano., T., Morita, C., Yamaguchi, M., Maeda, T., Katsuoka, Y. 2002.** Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration. Journal of Microbiological Methods. Vol. 49: 285-293.

**Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N., Mahadik, K. R. 2008.** Biofilm: Importance and applications. Indian Journal of Biotechnology. Vol. 8: 159-168

**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.

**Lee, S.H., y Frank, J.F. 1991.** Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogene* hypochlorite and heat. Journal of Food Protection. Vol. 54: 4–6.

**Liu, C., J. Duan, y Y.C. Su. 2006.** Effects of electrolyzed water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing surfaces. International Journal of Food Microbiology. Vol. 106:248–253.

**Lomander, A., Schreuders, P., Russek-Cohen, E., Ali, L. 2004.** Evaluation of chlorines´ impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. Bioresource Technology. Vol. 94: 275-283.

**Lunden JM, Miettinen MK, Autio TJ, Korkeala HJ. 2000.** Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact time. Journal of Food Protection. Vol. 63: 1204 7.

**McEldowney, S., Fletcher, M. 1987.** Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. Archives of Microbiology. Vol. 148: 57-62.

**Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., Mccaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. 1999.** Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases Journal. Vol. 5: 607-625

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

**Moltz, A. G., y S. E. Martin. 2005.** Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. Journal of Food Protection. Vol. 68: 92–97.

**Musk, D. J., Hergenrother, P.J. 2006.** Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 13:2163-2177.

Norma oficial mexicana NOM-120-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas. 24 de agosto 2011.

**Pan, Y., F. Breidt, Jr., y S. Kathariou. 2006.** Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilm to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72: 7711- 7717.

**Parish, M., Beuchat, L., Suslow, T., Harris, L., Garrett, E., Farber, J., Busta F. 2003.** Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 2: 22-32.

**Park, H., Hung, Y., Chung, D. 2004.** Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 91: 13-18.

**Reinemman, D. J., Graeme, A., Bray, D., Reid, D., Britts, J. 1998.** Resolviendo los altos recuentos bacterianos en leche. *Novedades lácteas. Ordeño y calidad de la leche*. Vol. 42: 1-8

**Riedel, U. C., Monk, R. I., Casey, P. G., Morrissey, D., O'Sullivan, G. C., Tangney, M., Hill, C., y Gahan, G. M. 2007.** Improved Luciferase tagging system for *Listeria monocytogenes* allows real-time monitoring *in vivo* and *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73: 3091-3094

**Riedel, U. C., Monk, R. I., Casey, P. G., Waldmann, M. S., Cormac G. M., Hill, C., y Gahan, G. M. 2009.** AgrD-dependent *quorum sensing* affects biofilm formation invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*. Vol. 71: 1177-1189.

**Robbins, J. B., C. W. Fisher, A. G. Moltz, y S. E. Martin. 2005.** Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine and hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*. Vol. 68: 494–498.

**Smith, J. L., Fratamico, P. M., Novak, J. S. 2004.** Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*. Vol. 67:1053-1070.

- Smoot, L., Pierson, M. 1998.** Effect of environmental stress on the ability of *Listeria 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). 23 de Febrero de 2011.
- Trachoo, N. 2003.** Biofilms in the food industry. *Journal of Science Technology*. Vol. 25: 807-815
- Trémoulet, F., O. y Duché. 2002.** Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 210: 25-31.
- Tresse, O., Shannon, K., Pinon, A., Malle, P., Vialette, M., y Midelet-Bourdin, G. 2007.** Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. *Journal of Food Protection*. Vol. 70: 1569-1578.
- Vaid, R., Linton, R., Morgan, M. 2010.** Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. *Food Microbiology*. Vol. 27: 979-984.
- Van Haecke, E., Remon, J., Moors, M., Raes, F., De Rudder, D., Van Peteghem. 1990.** Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesión to 304 and 306-L stainless Steel: roles of cells surface hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 56: 788-795.
- 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.
- Watnick, P., Kolter, R., 2000.** Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*. Vol. 182: 2675-2679.
- Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U. 2000.** Heterogeneity in biofilms. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. Vol. 24: 661-71.



## X. ANEXOS

### Tratamiento de células libres con agua electrolizada neutra

Se prepararon tubos de rosca con 9 mL de AEN a 5, 7, 9 y 12 ppm de cloro libre y 9 mL de agua desionizada como control.

Para la preparación del inóculo el cultivo activado de 18 h de *L. monocytogenes* EDGe se centrifugó 10 000 x g por 10 minutos. Se removió el sobrenadante y se resuspendió usando la misma cantidad de solución salina 0.85%, este proceso se repitió para un total de 2 lavados y como último paso se resuspendió el paquete celular en solución salina 0.85% estéril. Se utilizó un inóculo, de alrededor de 9 log UFC/mL, Todos los tubos de AEN y agua desionizada se aclimataron durante 15 min a temperatura ambiente.

Una vez aclimatados los tubos se colocó 1 mL de inóculo a cada tubo de las soluciones de tratamiento y control. Se evaluó el efecto de las concentraciones de 5, 7, 9 y 12 ppm de cloro libre en AEN a los 1, 3 y 5 min de tiempo de exposición para células libres de *L. monocytogenes* EDGe a temperatura ambiente

Transcurridos los tiempos de exposición se tomó 1 mL de cada tubo de tratamiento y se transfirió a 9 mL de solución de amortiguador neutralizante (5.2 g/L, amortiguador neutralizante, Difco) que contenía una mezcla de 0.0043% fosfato mono potásico, 0.016% tiosulfato de sodio y 0.5% de aril sulfonato durante 10 s para neutralizar el cloro residual del agua electrolizada (Ayebah *et al.*, 2006 y Robbins *et al.*, 2005).

De manera siguiente se realizaron diluciones sucesivas y se determinó el número de células viables mediante el método de Miles-Misra en placas de Agar LB suplementados con cloranfenicol

Cuadro A1. Inactivación de células libres de *Listeria monocytogenes* EDGe por la exposición de 0, 5, 7, 9 y 12 ppm de cloro libre en AEN por un tiempo de contacto de 1, 3 y 5 minutos.

Tiempo (min)	0 ppm	5 ppm	7 ppm	9 ppm	12 ppm
	log UFC/mL	log UFC/mL	log UFC/mL	log UFC/mL	logUFC/mL
0	7.47±0.09	7.47±0.09	7.47±0.09	7.47±0.09	7.47±0.09
1	7.91±0.01	6.55±0.36	6.61±0.17	1.70±0.00	1.70±0.00
3	7.90±0.03	6.64±0.24	6.14.41±0.38	1.70±0.01	1.70±0.01
5	7.86±0.02	6.80±0.45	5.33±0.59	1.70±0.02	1.70±0.02

Cuadro A2. Concentración mínima bactericida (CMB) en un tiempo de contacto de 1 min en células libres para *Listeria monocytogenes* EDGe.

Concentración de cloro libre en	
AEN (ppm)	log UFC/mL
0	7.47±0.09
5	6.55±0.36
7	6.61±0.17
9	1.70±0.00
12	1.70±0.00

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

Tiempo (días)	Vidrio log UFC/cm <sup>2</sup>	Acero log UFC/cm <sup>2</sup>
0	10.36±0.12	10.36±0.12
1	7.16±0.55	6.45±0.10
2	5.96±0.40	6.19±0.20
3	6.51±0.20	5.76±0.32
4	6.33±0.13	5.40±0.54
5	6.79±0.11	5.96±0.52

Cuadro A4. Inactivación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EDGe por 0, 28, 30, 37 ppm de cloro libre en AEN durante un tiempo de exposición de 15, 20, 25, 30 min

Tiempo (min)	0 ppm log UFC/cm <sup>2</sup>	28 ppm log UFC/cm <sup>2</sup>	30 ppm log UFC/cm <sup>2</sup>	37 ppm log UFC/cm <sup>2</sup>
15	4.92±0.39	1.94±0.16	3.24±0.48	4.99±0.34
20	4.56±0.29	2.70±0.52	2.46±0.28	2.43±0.26
25	4.94±0.17	3.59±0.49	2.41±0.17	2.18±0.40
30	5.30±0.06	3.86±0.34	3.09±0.13	2.91±0.15

Cuadro A5. Inactivación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EDGe por 70 y 117 ppm de cloro libre en AEN durante un tiempo de exposición de 15 y 20 min en superficies de acero inoxidable

Tiempo (min)	0 ppm	70 ppm	117 ppm
	log UFC/cm <sup>2</sup>	log UFC/cm <sup>2</sup>	log UFC/cm <sup>2</sup>
15	3.56±0.22	3.34±0.36	3.19±0.22
20	4.18±0.25	1.70±0.00	1.70±0.00

Cuadro A6. Concentración mínima bactericida (CMB) en un tiempo de contacto de 20 min de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EDGe en superficies de acero inoxidable.

Concentración de cloro libre en AEN (ppm)	log UFC/cm <sup>2</sup>
0	4.56±0.29
28	2.70±0.52
30	2.46±0.28
37	2.43±0.26
70	1.70±0.00
117	1.70±0.01

Cuadro A7. Inactivación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EDGe por 70 ppm de cloro libre en AEN durante un tiempo de exposición de 20 min en superficies de vidrio.

Concentración de cloro	
libre en AEN (ppm)	log UFC/mL
población al 5to día	4.92±0.39
0	4.64±0.06
70	1.70±0.00