

TRABAJO FINAL INTEGRADOR PARA OPTAR POR EL TITULO DE ESPECIALISTA EN SEGURIDAD ALIMENTARIA

Facultad de Cs. Veterinarias - Universidad Nacional de La Plata



“Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización”

Aspirante: Med. Vet. Julian H de la Torre

Director: MSc. Julio A. Copes

Año 2018

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

*“Y conoceréis la verdad,
y la verdad os hará libres.”*

Juan 8:32

Índice

Índice	- 3 -
Resumen	- 5 -
1-Introducción	- 6 -
2-Enfermedades transmitidas por alimentos.....	- 9 -
2.1- Principales enfermedades transmitidas por los alimentos y sus causas	- 10 -
2.2- Bacterias	- 10 -
2.3- Virus	- 11 -
2.4- Parásitos	- 11 -
2.5- Priones	- 11 -
2.6- Sustancias químicas.....	- 12 -
2.7- Carga de las enfermedades de transmisión alimentaria.....	- 12 -
3-Biopelículas	- 13 -
3.1-Estructura de las biopelículas.....	- 15 -
Etapa 1	- 16 -
Etapa 2.....	- 17 -
Etapa 3.....	- 17 -
Etapa 4.....	- 18 -
Etapa 5.....	- 18 -
3.2- Sanitización.....	- 19 -
3.3- Hipoclorito de sodio	- 19 -
3.4- Acido hipocloroso	- 20 -
3.5- Detergentes aniónicos.....	- 20 -
3.6- N-acetilcisteína.....	- 20 -
4- Objetivos.....	- 21 -
4.1 Objetivo general.....	- 21 -

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

- 4.2- Objetivos específicos..... - 21 -
- 5- Materiales y métodos..... - 22 -
 - 5.1-Toma de muestra - 22 -
 - 5.2- Selección de las cepas para el ensayo *in vitro* - 23 -
 - 5.3- Formación de la Biopelícula - 23 -
 - 5.4- Búsqueda de microorganismos patógenos - 25 -
 - 5.5- Protocolo de sanitización..... - 26 -
 - 5.5.1- Tratamiento N°1 - 26 -
 - 5.5.2- Tratamiento N°2 - 27 -
 - 5.6- Análisis estadístico - 28 -
- 6- Resultados..... - 29 -
 - 6.1- Características de las cepas aisladas - 29 -
 - 6.2- Formación de la biopelícula..... - 31 -
 - 6.3- Tratamientos sobre las biopelículas - 32 -
 - 6.3.1- Tratamiento N°1 - 32 -
 - 6.3.2- Tratamiento N°2 - 32 -
 - 6.4- Análisis estadístico - 32 -
- 7-Conclusiones - 33 -
- 8-Anexo - 34 -
- 9-Bibliografía..... - 35 -

Resumen

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LaMA), de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y en el Comedor Universitario. El mismo consistió en aislar, a partir de hisopados en superficie de las bandejas de acero inoxidable, bacterias capaces de formar biopelículas. Estudiar las características tintoriales y morfológicas. También se realizó la búsqueda de los microorganismos patógenos más comunes en alimentos (*Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 y *Listeria monocytogenes*). Las cepas aisladas capaces de formar una biopelícula *in vitro* se enfrentaron a dos estrategias de sanitización para establecer cuál de ellas es más eficaz en la reducción en el número de microorganismos. Los resultados obtenidos permiten observar que solo una de las 16 cepas aisladas pudo desarrollar biopelículas *in vitro* y que no se aislaron microorganismos patógenos. De las dos estrategias de sanitización propuestas, el protocolo N°1 (detergente aniónico e hipoclorito de sodio) resultó ser más efectivo al momento de eliminar la biopelícula de la superficie.

Palabras clave: biopelícula, alimentos, sanitización, enfermedad transmitida por alimentos, ácido hipocloroso.

1-Introducción

Los alimentos proveen a un organismo los nutrientes necesarios para desarrollar actividades metabólicas de mantenimiento, crecimiento y reproducción. Así mismo estos alimentos pueden ser el vehículo de agentes causales de enfermedad (Cervera, 2001). La contaminación cruzada suele ser el mecanismo más habitual por el cual los alimentos sufren contaminación física, química o biológica (Arzu, 2000). En conjunto estas enfermedades reciben la denominación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).

En la actualidad se describen cientos de enfermedades de este tipo, las cuales afectan la salud de personas de todo el mundo, de todas las edades y condiciones sociales. Es evidente que las condiciones higiénicas y sanitarias de un local elaborador de alimentos son de suma importancia para prevenir el riesgo de transmitir una enfermedad, y en este sentido las estrategias de sanitización adecuadas a cada necesidad y ejecutadas correctamente contribuyen a prevenir la ocurrencia de brotes de ETA (Kopper, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la Seguridad Alimentaria como la “ausencia de peligros asociados a los productos alimentarios susceptibles de comprometer la salud de los consumidores” y La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define que “la Seguridad Alimentaria existe cuando todas las personas tienen acceso en todo momento (ya sea físico, social, y económico) a alimentos suficientes, seguros y nutritivos para cubrir sus necesidades nutricionales y las preferencias culturales para una vida sana y activa (Leotta, 2018). Estas definiciones nos aproximan al análisis de situación que se genera al abordar los temas relacionados con la Seguridad Alimentaria, sin dejar de lado los peligros biológicos, químicos y físicos, ni la satisfacción plena del consumidor en el aspecto nutricional, organoléptico, sanitario y cultural. Entiéndase todo aquello relacionado con las preferencias religiosas y regionales como parte de las necesidades de un ser humano.

El diseño de intervenciones para la prevención de eventos de salud relacionados con la industria de los alimentos, guarda estrecha relación con el conocimiento de los mecanismos de contaminación. Por esta razón fue propuesto

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

este trabajo, enfocado al estudio de un fenómeno importantísimo en la contaminación biológica de alimentos como es el de las biopelículas.

Las biopelículas constituyen una comunidad extremadamente variable en cuanto a su composición de microorganismos, pudiéndose encontrar tanto bacterias como hongos. En la actualidad son consideradas responsables de un gran número de infecciones nosocomiales, como así también responsables de la contaminación y deterioro de productos de la industria farmacéutica y alimentaria (Ossa, 2010). Esta comunidad pluricelular constituye una estrategia de supervivencia y magnificación del potencial de los distintos microorganismos que la componen, conformando una unión entre diferentes especies con el objeto de perpetuarse en el tiempo (Mora Collazos, 2017).

Estas estructuras han aumentado el riesgo de contaminación microbiana en plantas de alimentos de un modo tal que pudieran suscitar un brote de origen alimentario, de esta forma constituyen un gran problema para la industria alimentaria y la salud pública, ya que pueden proveer un ambiente de bacterias patógenas y son causantes del deterioro de los alimentos y equipos, generando un gran impacto económico. Las características estructurales de las biopelículas plantean un desafío permanente para la industria en lo que se refiere al desarrollo o aplicación de metodologías y productos de limpieza y desinfección, lo cual otorga a las biopelículas una importancia sobresaliente en la aplicación de procedimientos de sanitización (González, 2015). Por otra parte podemos mencionar el incremento de la población de riesgo frente a las enfermedades no solo en nuestro país sino también en toda América Latina. En los últimos tiempos la población en América latina y el Caribe ha demostrado un aumento considerable en la cantidad de personas en edad de riesgo. En el año 2000 la población regional de 60 años y más era de 43 millones de personas cifra que irá en aumento hacia el año 2025, cuando las personas de edad alcancen los 100,5 millones. El mismo informe revela que para el año 2025 la cifra será cercana al 15%. Para el año 2050 las personas de edad representarán aproximadamente el 24% de la población, de tal manera que una de cada cuatro personas tendrá 60 años o más. Para la República Argentina se estima que las cifras serán de la siguiente manera, para el año 2025 el 16,9% y para el 2050 el valor será aproximado al 24,7 % de personas mayores de 60 años o más. Con estas cifras se puede observar el

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su
respuesta a distintas estrategias de sanitización

crecimiento que tendrá el envejecimiento de la población especialmente en
nuestro país (Gaviglio, 2014).

2-Enfermedades transmitidas por alimentos

Se define a una enfermedad transmitida por alimentos como un conjunto de síntomas y signos clínicos originados por el consumo de productos alimenticios, ingredientes, especias, bebidas y agua, que contienen agentes patógenos o sustancias tóxicas en cantidades tales que afectan la salud de una persona o grupo de personas en forma aguda o crónica. Es importante considerar que no solo las bacterias son causales de ETA, además los virus, hongos, parásitos, sustancias químicas (toxinas, metales pesados, pesticidas, etc.) y priones están incluidos en la lista. El acceso a alimentos inocuos y nutritivos en cantidad suficiente es fundamental para mantener la vida y fomentar la buena salud (Martínez, 2016). Los alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer. Se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas –casi 1 de cada 10 habitantes– por ingerir alimentos contaminados y que 420 000 mueren por esta misma causa. Los niños menores de 5 años soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 125 000 defunciones en este grupo de edad. Las infecciones diarreicas, que son las más comúnmente asociadas al consumo de alimentos contaminados, hacen enfermar cada año a unos 550 millones de personas y provocan 230 000 muertes (Olea, 2012).

La inocuidad de los alimentos, la nutrición y la seguridad alimentaria están complejamente relacionadas. Los alimentos insalubres generan un círculo vicioso de enfermedad y malnutrición, que afecta especialmente a los lactantes, los niños pequeños, los ancianos y los enfermos.

Al ejercer una presión excesiva en los sistemas de atención de la salud, las ETA obstaculizan el desarrollo económico y social, y perjudican a las economías nacionales, al turismo y al comercio. En la actualidad, las cadenas de suministro de alimentos atraviesan numerosas fronteras nacionales. La buena colaboración entre los gobiernos, los productores y los consumidores contribuye a garantizar la inocuidad de los alimentos (Rodríguez Herazo, 2016).

2.1- Principales enfermedades transmitidas por los alimentos y sus causas

Las ETA son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados (Pinillos, 2003) Los patógenos de transmisión alimentaria pueden causar diarrea grave o infecciones debilitantes, como la meningitis. La contaminación por sustancias químicas puede provocar intoxicaciones agudas o enfermedades de larga duración, como el cáncer (Parra Trujillo, 2003). Las ETA pueden causar discapacidad persistente y muerte (Mylonakis, 1998). Algunos ejemplos de alimentos insalubres son los alimentos de origen animal no cocinado, las frutas y hortalizas contaminadas con heces y los mariscos crudos que contienen biotoxinas marinas (del Carmen Montenegro-Salazar, 2006).

2.2- Bacterias

Salmonella spp., *Campylobacter spp.* y *Escherichia coli* enterohemorrágica figuran entre los patógenos de transmisión alimentaria más comunes que afectan a millones de personas cada año, a veces con consecuencias graves o mortales. Los síntomas son fiebre, dolores de cabeza, náuseas, vómitos, dolores abdominales y diarrea. Los alimentos asociados con los brotes de salmonelosis son, por ejemplo, los huevos, la carne de ave y otros productos de origen animal. Los casos de infección por *Campylobacter spp.* de transmisión alimentaria son causados principalmente por la ingestión de leche cruda, carne de ave cruda o poco cocinada y agua potable. *Escherichia coli* enterohemorrágica se asocia con el consumo de leche no pasteurizada, carne poco cocinada y fruta y hortalizas frescas (Sanna, 2016)

La infección por *Listeria spp.* provoca abortos espontáneos y muerte neonatal. Si bien la frecuencia de la enfermedad es relativamente baja, la gravedad de sus consecuencias, que pueden llegar a ser mortales, sobre todo para los lactantes, los niños y los ancianos, sitúa a la listeriosis entre las infecciones de transmisión alimentaria más graves. *Listeria spp.* se encuentra en los productos lácteos no pasteurizados y en diversos alimentos preparados, y puede crecer a temperaturas de refrigeración (Rossi, 2008).

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

La infección por *Vibrio cholerae* se transmite por la ingestión de agua o alimentos contaminados. Los síntomas son, entre otros, dolores abdominales, vómitos y diarrea acuosa profusa, que pueden dar lugar a deshidratación grave y provocar la muerte. Los alimentos asociados con brotes de cólera son el arroz, las hortalizas, las gachas de mijo y varios tipos de mariscos (Borbolla-Sala, 2004).

2.3- Virus

Los síntomas característicos de las infecciones causadas por norovirus son las náuseas, los vómitos explosivos, la diarrea acuosa y los dolores abdominales. El virus de la hepatitis A puede provocar enfermedades hepáticas persistentes y se transmite en general por la ingestión de mariscos crudos o poco cocinados o de productos crudos contaminados. La manipulación de alimentos por personas infectadas suele ser la fuente de la contaminación (Bofill-Mas, 2005).

2.4- Parásitos

Algunos parásitos, como los trematodos presentes en el pescado, únicamente se transmiten a través de los alimentos. Otros, en cambio, como *Echinococcus spp* o *Taenia solium*, pueden infectar a las personas a través de los alimentos o por contacto directo con los animales. Otros parásitos, como *Ascaris*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica* o *Giardia*, se introducen en la cadena alimentaria a través del agua o el suelo, y pueden contaminar los productos frescos (Erch, 2015).

2.5- Priones

Los priones son agentes infecciosos constituidos por proteínas que se caracterizan por estar asociados a determinados tipos de enfermedades neurodegenerativas. La encefalopatía espongiforme bovina (EEB o “enfermedad de las vacas locas”) es una enfermedad por priones que afecta al ganado y que se relaciona con la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en el hombre. El consumo de productos cárnicos procedentes de bovinos que contienen materiales especificados de riesgo, como tejido cerebral, constituye la vía de transmisión más probable del prion al hombre (Fernandez Boj, 2003), (Eigen, 2001).

2.6- Sustancias químicas

Las sustancias que plantean más riesgos para la salud son las toxinas naturales y los contaminantes ambientales. Las toxinas naturales abarcan las micotoxinas, las biotoxinas marinas, los glucósidos cianogénicos y las toxinas presentes en las setas venenosas. Los alimentos básicos como el maíz o los cereales pueden contener elevados niveles de micotoxinas, como la aflatoxina y la ocratoxina. Una exposición prolongada a esas toxinas puede afectar al sistema inmunitario y al desarrollo normal, o causar cáncer. Los contaminantes orgánicos persistentes son compuestos que se acumulan en el medio ambiente y en el organismo humano. Los ejemplos más conocidos son las dioxinas y los bifenilos policlorados, que son subproductos indeseados de los procesos industriales y de la incineración de desechos. Se hallan en el medio ambiente en todo el mundo y se acumulan en la cadena alimentaria animal. Las dioxinas son compuestos muy tóxicos que pueden causar problemas reproductivos y de desarrollo, dañar el sistema inmunitario, interferir en el funcionamiento hormonal y causar cáncer. Los metales pesados como el plomo, el cadmio y el mercurio causan daños neurológicos y renales. La presencia de metales pesados en los alimentos se debe principalmente a la contaminación del aire, del agua y del suelo (Vega, 1991).

2.7- Carga de las enfermedades de transmisión alimentaria

La carga que las ETA imponen a la salud pública, el bienestar social y la economía se ha subestimado a menudo debido a la subnotificación y la dificultad para establecer una relación de causalidad entre las contaminaciones de alimentos y las enfermedades o muertes por ellas provocadas (Neira Gonzalez, 2003).

3-Biopelículas

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados, bacterias planctónicas, de libre flotación y bacterias en biopelículas como colonias de microorganismos sésiles. Una biopelícula es definida como una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies protegidas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS “Extracellular polymeric substances”) autogeneradas y fijadas a una superficie inerte o un tejido vivo. Actualmente se piensa que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas. Incluso se considera que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biopelículas y tan sólo el 1% vive en estado planctónico. La matriz extracelular está formada por un 97% de agua y el resto está compuesto principalmente por exopolisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos. Las EPS protegen a los microorganismos dentro de la biopelícula, contra agentes antimicrobianos, previenen el acceso de biocidas, quelantes, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes, lo que ocasiona que sean muy difíciles de eliminar. Los componentes de la matriz extracelular varían considerablemente según la superficie y las condiciones ambientales en que se establezca. En la formación de biopelículas están implicados factores como el medio ambiente físico y químico y la interacción entre células; las que determinarán la estructura, función y composición de éstas. Las superficies de la mayoría de las células bacterianas están cargadas negativamente, lo que genera una condición desfavorable para la adhesión bacteriana debido a la fuerza de repulsión electrostática. Sin embargo, las fimbrias y flagelos le otorgan a la bacteria la propiedad de hidrofobicidad y la capacidad de movimiento a la célula, reduciendo así la fuerza de repulsión al enfrentarse a otra superficie; mientras que los lipopolisacáridos (LPS) confieren propiedades hidrófilas a la célula, característica importante para la unión a los materiales hidrofílicos. Posterior a esta primera unión a la superficie, las bacterias comienzan la producción de la matriz extracelular formada por un conglomerado de diferentes biopolímeros (EPS), los que permitirán la adhesión a la superficie y la cohesión de las células de la biopelícula. La composición del EPS es diferente en cada bacteria. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que una

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula (Díaz, 2011).

La colonización de los microorganismos y su posterior desarrollo como una estructura compleja en forma de biopelícula se menciona en diversidad de ambientes. Las biopelículas le permiten a los microorganismos sobrevivir en ambientes hostiles, siendo su comportamiento y fisiología significativamente diferentes de aquellos microorganismos que crecen en medio líquido. La importancia de estas estructuras microbianas complejas reside en la existencia de un nivel de diferenciación que requiere un sofisticado sistema de señales célula-célula y un grado de especialización celular. El proceso de desarrollo de una biopelícula es único en biología debido a que involucra la actividad coordinada de varios genomas de procariotas relativamente pequeños, en comparación con los grandes genomas eucarióticos, para generar una comunidad funcional multicelular. Se pueden encontrar biopelículas en todos los medios en donde existan microorganismos en el medio natural, clínico o industrial. Sólo se requiere la presencia de un medio hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse en gran variedad de superficies. La presencia de biopelículas en una gran diversidad de ambientes trae como consecuencia una importante y variada cantidad de problemas. Esta noción modifica el conocimiento que se tenía de las bacterias debido a que las células individuales que se han estudiado en cultivos planctónicos en realidad son miembros de una comunidad multicelular cuya complejidad y sofisticación recién ha sido apreciada en las últimas décadas (Monds, 2009).

Las biopelículas generan un medioambiente dinámico, donde se intercambia material genético extracromosómico, enzimas y otras moléculas. Estudios demuestran una tasa de transferencia génica mediada por plásmidos, enormemente incrementada entre las bacterias de las biopelículas, donde la redistribución de genes entre éstas es un proceso continuo con importantes consecuencias en su adaptación evolutiva (Molin, 2003). Desde la década de 1970 se ha documentado la acumulación bacteriana en traqueo-tubos de unidades de terapia intensiva. La presencia de biopelículas Gram-negativas en estos tubos ha sido relacionada con neumonía. Además la placa dental es también

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

una biopelícula. La naturaleza de la placa dental comenzó a adquirir gran importancia poniéndose énfasis en los factores contribuyentes a la diversidad de ecosistemas, incluyendo pH, potencial de óxido-reducción y requerimientos nutricionales (Sottile, 1986).

3.1-Estructura de las biopelículas

Las primeras imágenes de biopelículas in vivo con el microscopio confocal de barrido, permitieron demostrar que las bacterias sésiles crecen dentro de microcolonias embebidas en una matriz polimérica que incluye canales abiertos. Este tipo de estructura abierta permite que el agua, presente en el ambiente en donde se desarrolla, penetre a través de los canales y por lo tanto los nutrientes lleguen a zonas profundas de la microcolonia dentro de la comunidad de la biopelícula. Este intercambio de nutrientes está facilitado por la arquitectura de la biopelícula, permite que estas comunidades desarrollen (Psaltis, 2007). Los mecanismos que dan lugar a la formación de una biopelícula pueden ser diversos, sin embargo la bibliografía consultada comúnmente se refiere a tres mecanismos principalmente. El primero menciona el proceso de fisión binaria de los microorganismos adheridos a una superficie. Otra forma descrita es el desplazamiento de los microorganismos a través de las superficies dando lugar a nuevos cúmulos de células. También se ha descrito la captación de microorganismos en estado libre por parte de la biopelícula incorporándolos a la misma (Dalton, 1996).

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

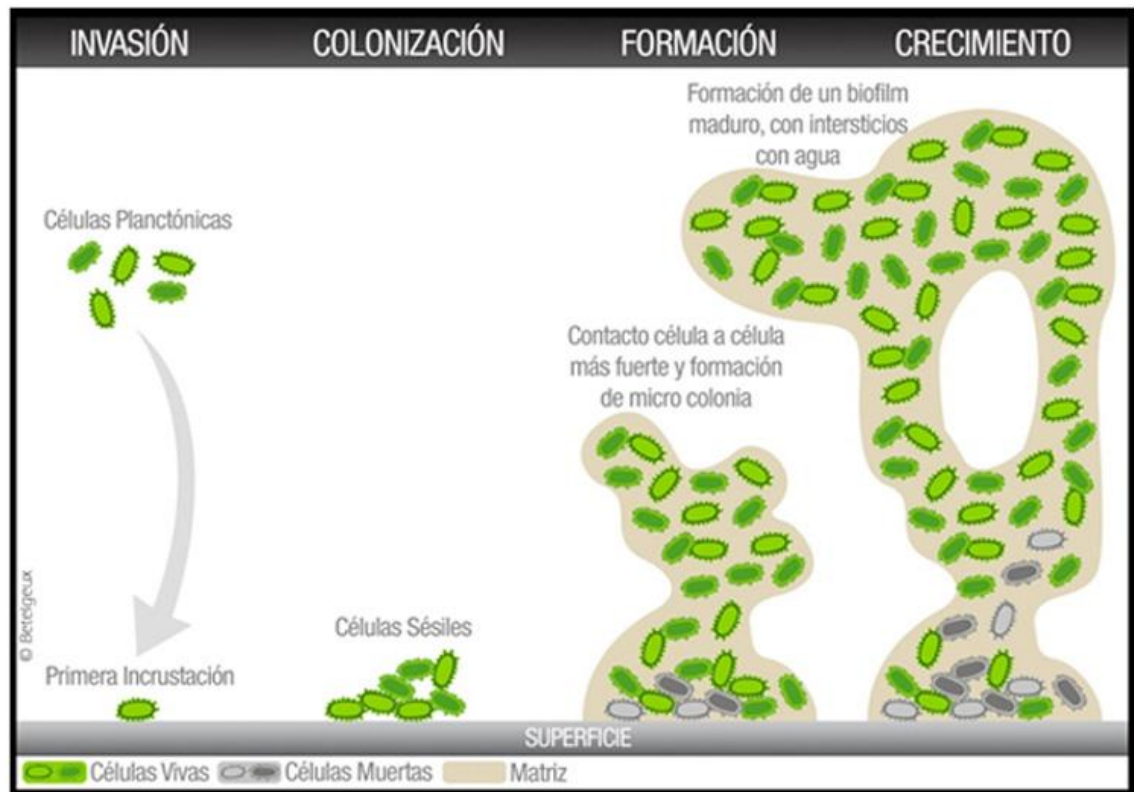


Imagen N° 1 Formación de una Biopelícula madura sobre superficie. (betelgeux)

Se describe la formación de biopelículas (Imagen N°1) a través de una serie de etapas (Costerton, 1999).

Etapas 1

El comienzo del transporte de los microorganismos hacia una superficie antecedido por la adsorción de una fina película orgánica sobre la superficie. Una biopelícula puede modificar características fisicoquímicas del sustrato dependiendo del tipo de moléculas adsorbidas sobre la superficie acondicionado la superficie para la colonización dando lugar aquí a la primera etapa. (Schneider, 1994). Los diversos factores externos que pueden afectar la adhesión de las bacterias desde un medio líquido sobre un sólido varían según su naturaleza. Los factores físicos más importantes son la tensión de corte, temperatura, rugosidad, topografía y carga superficial. Estos factores influyen el transporte, el desprendimiento y las reacciones en la interfaz. Por otra parte los factores químicos como la composición de la superficie del sustrato, la composición del medio en el que se desarrolla la biopelícula, el pH, el oxígeno disuelto (Characklis,

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

1981). Las superficies humectadas junto a la materia orgánica se conjugan para dar lugar al acondicionamiento de la superficie favoreciendo la adhesión bacteriana.

Etapas 2

La segunda etapa corresponde a la adhesión reversible de microorganismos donde interactúan diversas estructuras extracelulares de las bacterias (pilis, fimbrias y flagelos). La adhesión primaria (reversible) de bacterias a una superficie o a un sustrato puede ser de forma activa donde los apéndices extracelulares permiten que la bacteria alcance las superficies contrarrestando a las fuerzas de repulsión, aunque no es estrictamente necesario que presenten movilidad para aproximarse a la superficie, ya que muchas bacterias inmóviles también pueden formar biopelículas. Por otro lado la forma pasiva implica la intervención de factores externos como la fuerza de gravedad, fenómenos de difusión, precipitación y dinámica de flujos que intervienen en la adhesión a superficies (Navia, 2010).

Cuando las bacterias se aproximan a la interfaz, las fuerzas que actúan entre las células y la superficie determinan si esta habrá de ser atraída o repelida. Este tipo de fuerzas están relacionadas con las fuerzas de van der Waals y las fuerzas electrostáticas. Las fuerzas de van der Waals son generalmente atractivas y resultan de las interacciones entre dipolos inducidos entre moléculas de la partícula coloidal y moléculas de la superficie. Las fuerzas electrostáticas se generan a partir del solapamiento de las nubes electrónicas de las superficies cargadas y el cambio en la energía libre a medida que las superficies se alejan o se acercan. El resultado es una fuerza neta de atracción entre superficies cargadas opuestamente y una fuerza neta repulsiva entre superficies de cargas de igual signo (Diaz, 2011).

Etapas 3

La adhesión reversible se torna irreversible dando lugar a la tercera etapa donde se produce la transición desde una interacción débil de la célula con el sustrato hasta un enlace permanente, frecuentemente mediado por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares. Aquí entran en juego reacciones moleculares entre las estructuras superficiales bacterianas y la superficie del

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

sustrato. De esta forma se produce una adhesión firme entre la bacteria y la superficie mediadas por estructuras poliméricas superficiales como cápsulas, fibrilas, fimbrias, pilis y EPS. La adhesión irreversible específica puede ser definida como la unión específica entre las adhesinas y el sustrato (Nazar, 2007).

Etapa 4

La biopelícula sufre un proceso de maduración dando lugar a la formación de microcolonias con canales intercelulares siendo este fenómeno de maduración considerado como la cuarta etapa en la formación de una biopelícula. En esta etapa se da un incremento en la arquitectura de la biopelícula donde procesos de replicación y muerte de las bacterias y el depósito de sustancias orgánicas e inorgánicas confluyen para aumentar la densidad global de la biopelícula. Desde luego que el crecimiento de la biopelícula se ve restringido por el aporte de nutrientes y la penetración de estos al interior del mismo, como así también de los diversos factores externos que pueden variar (Delgado, 2016).

Etapa 5

La quinta etapa tiene lugar a partir del desprendimiento de algunas microcolonias o bien una sola célula de la biopelícula, para dar origen a una nueva biopelícula a distancia. Este mecanismo corresponde a una estrategia de supervivencia de la biopelícula, donde al encontrarse una masa crítica limitada por el aporte de nutrientes, interviniendo procesos de comunicación intercelular que programan la liberación de parte de la biomasa (Allison, 1998).

Las bacterias utilizan diversos tipos de mecanismos para enviar mensajes entre sí, este tipo de comunicación permite la coordinación de las acciones dentro de la biopelícula. El llamado *Quorum sensing* permitirle percibir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes, de modo que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal, de manera tal que mientras más bacterias se unen, se incrementa la concentración local de esta señal. Una vez logrado esto, se inducen diferentes fenómenos en la bacteria, para finalmente activar la diferenciación en la biopelícula (Bassler, 2006). Las principales moléculas señalizadoras o auto-inductoras que son empleadas para comunicarse con las demás bacterias son las acil-homoserina-lactonas, que predominan en

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

bacterias Gram-negativas, mientras que oligopéptidos modificados prevalecen en gérmenes Gram-positivos.

Así como el *Quorum Sensing* es un mecanismo de comunicación de largo alcance, se encuentran las señales de corto alcance que requieren el contacto directo entre las células individuales para el intercambio de información. Mediante mecanismos de comunicación mediada por los pilis las bacterias pueden transmitir mensajes célula a célula incluyendo factores relacionados con la patogenicidad (Goncalves, 2007).

Las características estructurales de las biopelículas plantean un desafío permanente para la industria en lo que se refiere al desarrollo o aplicación de metodologías y productos de limpieza y desinfección, lo cual les otorga una importancia sobresaliente en la aplicación de procedimientos de sanitización (González, 2015).

3.2- Sanitización

Sanitización es el proceso empleado para reducir el contenido de microorganismos viables remanentes en una superficie limpia. En la industria se emplea este término cuando se trata con agentes químicos o físicos las áreas de producción y los equipos empleados en la elaboración de productos con el propósito de reducir el contenido microbiano hasta niveles insignificantes (Guambo, 2013).

3.3- Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio es el desinfectante más empleado en la industria alimentaria, por su bajo costo es utilizado para la desinfección de superficies que están en contacto con alimentos y en el agua que se emplea para las distintas operaciones (Garmendia, 2006). El mecanismo de acción de este compuesto incluye la reducción de la tensión superficial, la saponificación de los ácidos grasos y la cloraminación, que está dada la interacción entre el cloro y el grupo amino dando lugar a la formación de cloraminas que interfieren en el metabolismo celular. (Estrella, 2002)

3.4- Acido hipocloroso

El ácido Hipocloroso (HClO) es un ion no disociado del cloro, caracterizado por su inestabilidad y elevado nivel de reactividad, siendo uno de los ácidos hipoalogenados más fuertes. Este es el responsable de la actividad bactericida de los compuestos derivados del cloro (Del Rosario, 2009). Es empleado como desinfectante, el cual al ingresar a la célula bacteriana a través de la membrana celular reacciona con las proteínas y ácidos nucleicos, en particular con el grupo sulfidriilo, grupos amino e indoles. La acción biocida de este compuesto es unas cien veces superior a la del Hipoclorito de sodio (Colombia, 2003).

3.5- Detergentes aniónicos

Los detergentes aniónicos presentan ventajas con respecto a otros tipos de detergente en lo que respecta a detergencia, humectancia y poder espumante, es por esta razón es que se emplean en la mayoría de las formulaciones comerciales (Callejas Gómez, 2009). Se caracterizan por poseer en su parte hidrofílica, grupos funcionales que se ionizan en contacto con el agua, originando iones orgánicos con carga negativa que son los responsables de su actividad sobre la tensión superficial (Cantarero Malagón, 2010).

3.6- N-acetilcisteína

Es una sustancia derivada del aminoácido Cisteína. Su empleo en medicina es ampliamente aceptado gracias a su poder mucolítico, relacionado con la ruptura de los puentes de sulfuro responsables de la viscosidad de los mucopolisacaridos. De esta manera también actúa como sustancia anti-biopelículas logrando una reducción de la estabilidad de la estructura de los mucopolisacaridos que componen la matriz extracelular de las biopelículas (Zaho, 2010), (Aslam, 2007).

4- Objetivos

4.1 Objetivo general

Aislar microorganismos capaces de generar biopelículas sobre las superficies en contacto con alimentos listos para ser consumidos.

4.2- Objetivos específicos

- A- Describir la diversidad morfológica de bacterias aisladas por hisopado de superficies en contacto con alimentos listos para consumir.

- B- Aislar microorganismos patógenos de los hisopados de bandejas de acero inoxidable.

- C- Evaluar la respuesta *in vitro* de una biopelícula aislada de una superficie en contacto con alimentos listos para consumir, frente a dos propuestas de sanitización.

5- Materiales y métodos

5.1-Toma de muestra

Se realizó la toma de muestras a partir de superficies en contacto con alimentos listos para ser consumidos. En este caso se seleccionaron aleatoriamente 20 bandejas rancheras de acero inoxidable (AISI 316) (imagen n°2). Estas bandejas fueron seleccionadas luego de haber sido preparadas para su uso según el protocolo de limpieza y desinfección que se lleva a cabo en dicho establecimiento diariamente. Las muestras fueron obtenidas mediante hisopado de un área de 2,25 cm², empleándose para ello hisopos estériles Eurotubo de madera y algodón. Cada hisopo fue colocado en tubo conteniendo 5 ml medio Letheen (Laboratorios Britania S.A. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) y mantenido a temperatura de refrigeración hasta ser procesado en el laboratorio en un lapso no mayor a 2 horas. Cada tubo conteniendo el hisopo fue agitado en agitador orbital durante un minuto, seguidamente se realizaron diluciones en base diez para proceder al recuento en placa con agar Agar para recuento en placa (PCA) (Difco, Detroit, Michigan, USA) inoculando por duplicado 0,1 ml en superficie y empleando espátula de Drigalsky para su distribución sobre la superficie. Las placas fueron incubadas a 37° C durante 48 h para luego realizar el recuento de unidades formadoras de colonias.



Imagen N°2 Bandeja de acero inoxidable AISI 316

5.2- Selección de las cepas para el ensayo *in vitro*

Para el ensayo fueron seleccionadas 16 colonias a partir de los recuentos obtenidos de los hisopados. El criterio empleado para la selección de las colonias fue la morfología macroscópica de la colonia (bordes, color, forma, aspecto y tamaño) y tomar aquellas colonias predominantes en las placas de los distintos hisopados (Imagen N°3). Una vez seleccionadas las colonias se le realizó a cada una de ellas la coloración de Gram. Cada cepa fue cultivada en Caldo Cerebro Corazón (CCC) (Difco, Detroit, Michigan, USA), a 25° C durante 18 h.

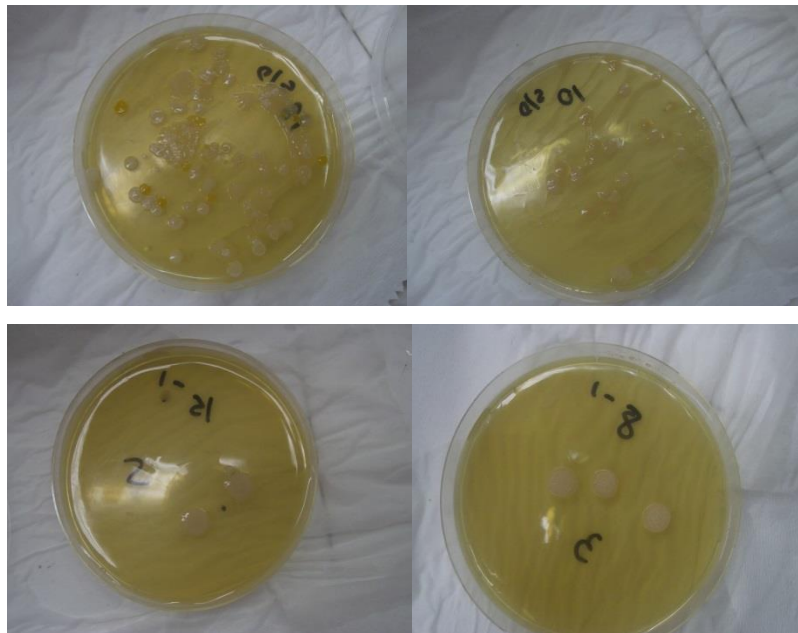


Imagen N°3 Colonias obtenidas de las bandejas

5.3- Formación de la Biopelícula

Se empleó un tubo conteniendo CCC y una placa de 2,25 cm² del mismo material empleado en las bandejas (Imagen N°4), se inoculó con 0,1 ml de un cultivo *overnight* a 25 °C en CCC de cada una de las cepas seleccionadas. Este paso fue realizado con la finalidad de obtener una biopelícula *in vitro* con las cepas recogidas del muestreo inicial. Los tubos fueron incubados a 25° C por duplicado durante 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h, empleándose un total de 16 tubos por cepa.

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

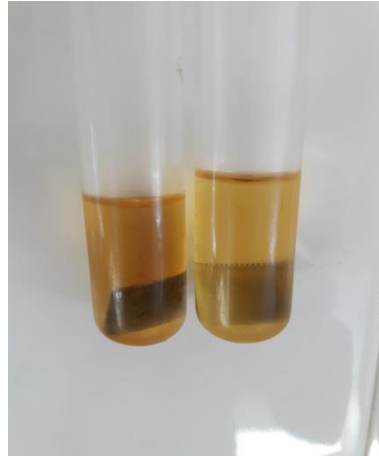


Imagen N°4 Tubos conteniendo las placas de acero

Una vez completado el tiempo de incubación, se descartó el medio de cultivo mediante pipeta, y se incorporó a dicho tubo 10 ml de solución fisiológica al 0,9 % con agitación durante un minuto, repitiendo el proceso tres veces, con el objeto de eliminar físicamente aquellas bacterias que no presentaran adherencia en la superficie de la placa. La placa metálica se extrajo del tubo mediante un imán a través de la pared tubo y luego se sujetó por un extremo con una pinza de acero quirúrgico Kocher estéril. La placa fue hisopada en una de sus caras en forma vertical, horizontal y oblicua (15 veces en total) con distintas caras del hisopo para maximizar la recuperación de las bacterias que pudieran estar conformando una biopelícula sobre dicha superficie. El hisopo se introdujo en un tubo conteniendo 2 ml de CCC, al cual se le realizó agitación durante 1 minuto, seguidamente se realizaron cinco diluciones en base diez de cada uno de los hisopados. De la muestra sin diluir y las cinco diluciones fueron sembradas en PCA 0,1 ml de inóculo y distribuido sobre la superficie con espátula de Drigalsky, por duplicado. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 37° C y se realizó el recuento para microorganismos mesófilos.

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

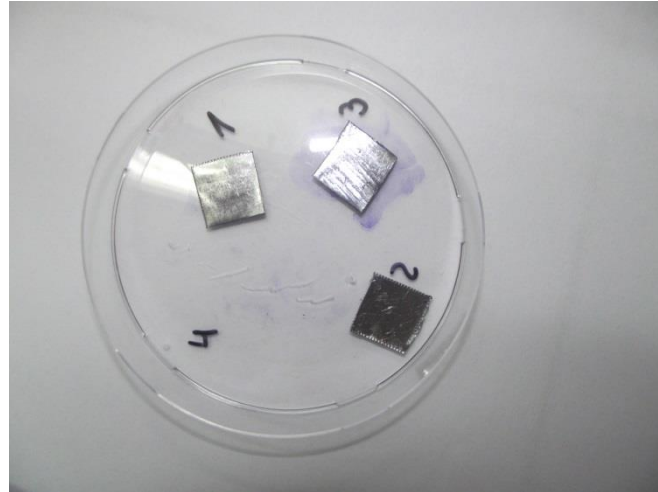


Imagen N°5 Placas de acero inoxidable AISI 316

5.4- Búsqueda de microorganismos patógenos

Paralelamente a la realización del ensayo de formación de biopelículas con los microorganismos mesófilos, se realizó protocolo para aislamiento de microorganismos patógenos de interés en alimentos (*Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp.). El ensayo consistió en realizar un pre enriquecimiento de las muestras obtenidas por hisopado.

Para el aislamiento de *E. coli* O157 se tomó 1 ml de la muestra del caldo Litheen y se colocó en un tubo conteniendo 9 ml de caldo Tripticasa de Soya modificado con casaminoácidos y 20 mg/l de Novobiocina (Acumedia. Acumedia Corporation, San Bernardino, CA 92408. USA), este tubo se incubó durante 24 hs a 42° C. De dicho tubo se tomó 1 ml para realizar una reacción de inmunocromatografía para antígeno O157 (RapidCheck Strategic Diagnostics Inc, Newark, DE, USA). Las muestras resultantes positivas a la prueba de inmunocromatografía se sembraron en agar MacConkey (Acumedia). Para la confirmación de colonias sospechosas se empleó PCR múltiple (Leotta, 2005.)

Para el aislamiento de *Salmonella* spp se inoculó 1 ml del tubo de muestra y se colocó en 9 ml de Agua Peptonada Bufferada (APB, Britania) incubándose durante 24 hs a 37° C, seguidamente se colocó 0,1 ml en un tubo conteniendo caldo tetrionato que se incubó a 37° C durante 48 h y 1 ml en otro tubo conteniendo caldo Rappaport Vassiliadis (Biokar, Biokar Diagnostics, Beauvais,

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

France) que fue incubado a 42° C durante 48 h De estos tubos se tomó el inóculo para sembrar en estría por agotamiento en placas de agar XLT4 (Agar Xilosa, Lisina y tergitol 4), (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) y agar Hektoen (Merck, Darmstadt, Germany), las placas fueron incubadas durante 24 h Las colonias sospechosas fueron sembradas en pruebas bioquímicas de Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato (IMViC) para su confirmación.

Mientras que para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* se empleó 1 ml del tubo de la muestra inicial y se incorporó a un tubo de enriquecimiento conteniendo 9 ml de caldo Fraser (Difco) a mitad de concentración, que se incubó a 30° C durante 24 h, luego se empleó 1 ml en otro tubo conteniendo 10ml caldo Fraser (Difco) entero que se incubó a 35°C durante 48 h, de este último se sembró en estría por agotamiento en placas conteniendo agar Palcam (Oxoid) y agar Oxford (Oxoid).

5.5- Protocolo de sanitización

La Biopelícula obtenida *in vitro* fue enfrentada a dos estrategias de sanitización para evaluar su respuesta frente al procedimiento de rutina empleado en el Comedor Universitario (tratamiento N°1) y una alternativa propuesta para este estudio (tratamiento N°2).

Las cepas capaces de formar biopelículas *in vitro*, fueron identificadas por pruebas bioquímicas de Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato (IMViC) y PCR múltiple (Leotta, 2005.), y se inocularon a razón de 0,1 ml de un cultivo *overnight* en un tubo conteniendo 10 ml de CCC que a su vez contenía una chapa de acero inoxidable idéntica a las usadas en el resto de los ensayos y se incubó a 25 °C, durante 36 h (dado que en ese tiempo de incubación se logró el máximo nivel de adherencia).

5.5.1- Tratamiento N°1

Se colocó la chapa de acero previo desarrollo de la biopelícula, en un tubo estéril conteniendo 10 ml de una solución de detergente aniónico (Amon, Caesa S.A: Flcio. Varela, Bs.As. ARG.) al 2,5% según instrucciones del fabricante. Se

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

agitó por un minuto, luego se cepilló con cepillo dental de cerdas finas estéril durante 30 segundos. Una vez cepillada la chapa se enjuagó a través de tres tubos conteniendo 10 ml de solución fisiológica estéril cada uno, en los que se agitó durante 1 minuto cada uno de los tubos. Seguidamente la placa se colocó en otro tubo estéril conteniendo 10 ml de solución hipoclorito de sodio (Ayudín, Clorox, Aldo Bonzi, Bs. As. ARG) solución al 2,5 % (equivalente a 16250 ppm de cloro activo) durante 1 minuto. Luego se enjuagó nuevamente tres veces en solución fisiológica estéril. Todo el procedimiento se llevó a cabo por cuadruplicado. Una vez completado el tratamiento se tomó muestra de la placa metálica mediante hisopado según se detalló anteriormente. Cada hisopo fue colocado en tubo conteniendo 5 ml de medio Lethen (Britania). Cada tubo conteniendo el hisopo fue agitado en agitador durante un minuto, seguidamente se realizaron diluciones en base diez para proceder al recuento en placa con agar PCA inoculando por duplicado 0,1 ml en superficie y empleando espátula de Drigalsky para su distribución sobre la superficie. Las placas fueron incubadas a 37° C durante 48 h para luego realizar el recuento de unidades formadoras de colonias.

5.5.2- Tratamiento N°2

La chapa de acero inoxidable en la que se desarrolló la biopelícula se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 10ml de una solución pura de NAC Anti Bio Film (N Acetil Cisteína al 2%, Acido hipocloroso al 50%) y se agitó por un minuto, luego se cepilló con cepillo de cerdas finas durante 30 segundos. Una vez cepillada la chapa se pasó a través de tres tubos conteniendo 10 ml de solución fisiológica estéril cada uno, en los que se enjuagó durante 1 minuto cada uno de los tubos. Todo el procedimiento se llevó a cabo por cuadruplicado. Una vez completado el tratamiento se tomó muestra de la placa metálica mediante hisopado según se detalló en el tratamiento N°1. Cada hisopo fue colocado en tubo conteniendo 5 ml de medio Lethen (Britania). Cada tubo conteniendo el hisopo fue agitado en agitador durante un minuto, seguidamente se realizaron diluciones en base diez para proceder al recuento en placa con agar PCA inoculando por duplicado 0,1 ml en superficie y empleando espátula de Drigalsky para su distribución sobre la superficie. Las placas fueron incubadas a 37° C durante 48 h para luego realizar el recuento de unidades formadoras de colonias.

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización



Imagen N°6 NAC Anti Bio Film

5.6- Análisis estadístico

Para el presente trabajo se realizó la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, prueba de suma de rangos Wilcoxon, o prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. Una prueba estadística no paramétrica. Empleando el software XLSTAT (Addinsoft 1995-2018) versión 2018.2.

6- Resultados

6.1- Características de las cepas aisladas

Las 16 cepas seleccionadas fueron descritas en la tabla N° 1, de las cuales se observaron 13 cepas Gram negativas y 3 cepas Gram positivas.

En cuanto a la morfología del soma bacteriano se observó que 9 cepas presentaban formas de Bacilo y 7 cepas forma cocoide.

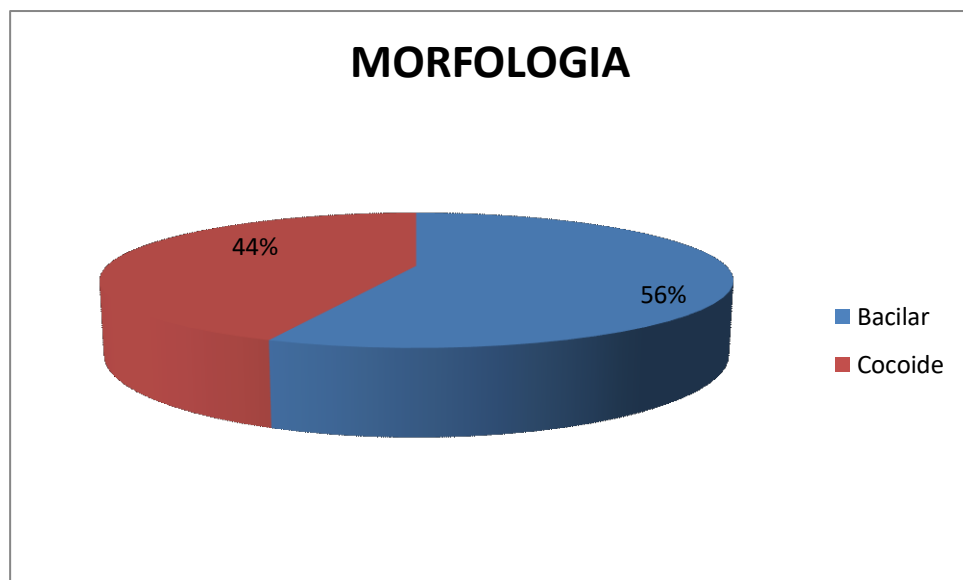


Grafico N°1 Distribucion porcentual de la forma bacteriana

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

CEPAS	FORMA	COLOR	TAMAÑO	BORDES	ASPECTO	GRAM	MORFOLOGIA
Cepa 1	Redonda	Blanco	2 mm	rugosos	Mucosa	Negativo	Cocoide
Cepa 2	redonda	blanco	1 mm	liso	mucosa	Positivo	Bacilar
Cepa 3	redonda	Blanco	5 mm	Festoneados	Mucosa	Positivo	Bacilar
Cepa 4	Redonda	Blanco	2 mm	Liso	Mucosa	Negativo	Cocoide
Cepa 5	Redonda	Transparente	4 mm	liso	Mucosa	Negativo	Cocoide
Cepa 6	Redonda	Blanco	2 mm	liso	Mucosa	Positivo	Bacilar
Cepa 7	Redonda	Blanco	3 mm	Festoneados	Mucosa	Negativo	Cocoide
Cepa 8	Redonda	Amarilla	5 mm	liso	Mucosa	Negativo	Bacilar
Cepa 9	Redonda	Blanco	2 mm	liso	Mucosa	Negativo	Cocoide
Cepa 10	Redonda	Blanco	2 mm	liso	Mucosa	Negativo	Bacilar
Cepa 11	Redonda	Transparente	3 mm	liso	Mucosa	Negativo	Bacilar
Cepa 12	Redonda	Blanco	3 mm	liso	Mucosa	Negativo	Bacilar
Cepa 13	Redonda	Transparente	2 mm	liso	Mucosa	Negativo	Bacilar
Cepa 14	Redonda	Blanco	5 mm	rugosos	Mucosa	Negativo	Cocoide
Cepa 15	Redonda	Blanco	2 mm	liso	Mucosa	Negativo	Bacilar
Cepa 16	Redonda	Transparente	2 mm	liso	Mucosa	Negativo	Cocoide

Tabla N°1 Características de las colonias, coloración de Gram y forma bacteriana.

(En amarillo la única cepa que fue capaz de formar biopelícula *in vitro*)

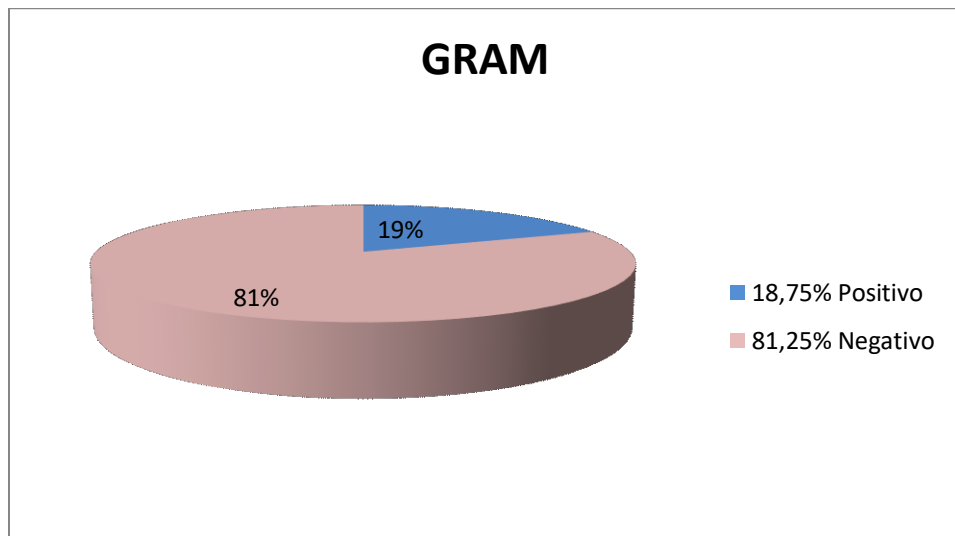


Gráfico N°2 Distribución porcentual de Gram positivos y Gram negativos

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

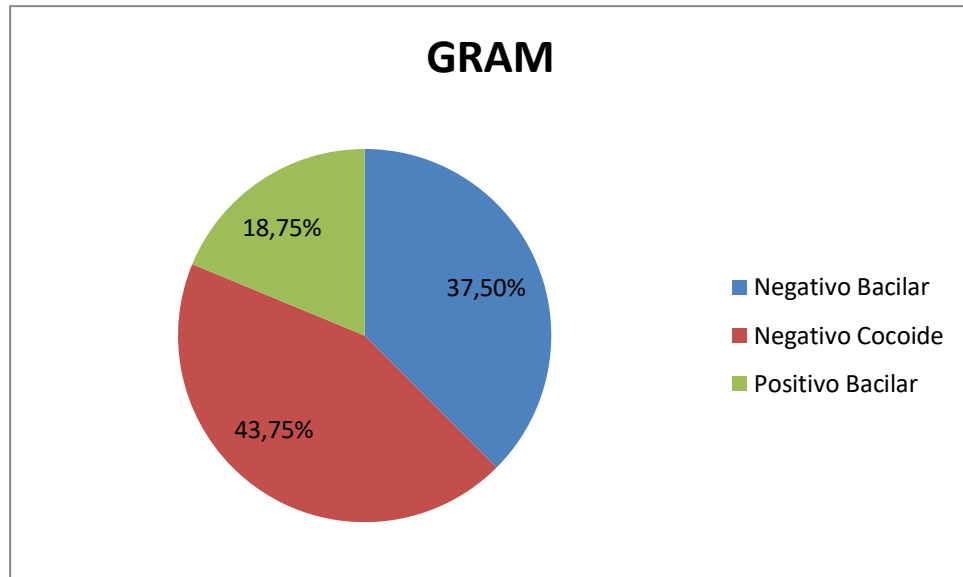


Gráfico N° 3 Distribución porcentual de la forma bacteriana y coloración de Gram

6.2- Formación de la biopelícula

De las 16 cepas seleccionadas para el presente estudio, solo una cepa fue capaz de adherirse a la placa de acero inoxidable *in vitro*, siendo esta cepa una *Escherichia coli* no toxigénica.

Se logró obtener el mayor desarrollo sobre las placas de acero inoxidable a las 36 h de incubación con una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonia/cm².

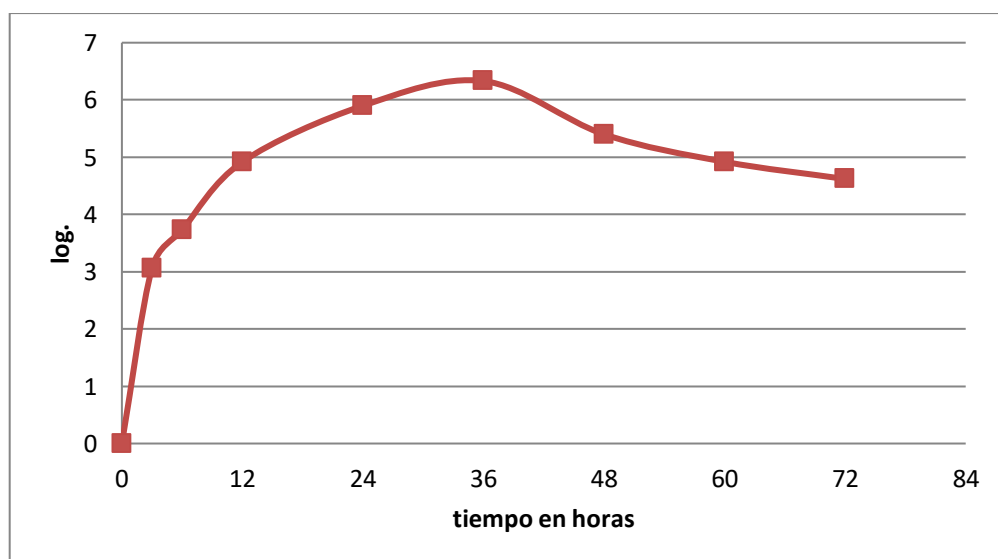


Gráfico N° 4 Recuento de unidades formadoras de colonias

6.3- Tratamientos sobre las biopelículas

Recuento de bacterias posterior a la aplicación del protocolo de sanitización. En la tabla se puede observar el recuento de UFC/cm²

6.3.1- Tratamiento N°1

Muestra 1	0
Muestra 2	0
Muestra 3	0
Muestra 4	1

6.3.2- Tratamiento N°2

Muestra 1	7
Muestra 2	11
Muestra 3	8
Muestra 4	3

6.4- Análisis estadístico

De la prueba estadística aplicada se obtuvo que las diferencias entre ambos tratamientos son significativas (-p 0,027). Ver Anexo N°1.

7-Conclusiones

Se puede afirmar que no todos los microorganismos que estaban presentes en las bandejas son formadores de biopelículas, ya que, de las 16 cepas aisladas, solo una fue capaz de generar una biopelícula *in vitro*.

No se aislaron en las bandejas *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* ni *Escherichia coli* O157.

La estrategia de sanitización que se aplica en el Comedor Universitario resulta ser eficaz, ya que elimina casi la totalidad de los microorganismos. Sin embargo el hecho de haber aislado microorganismos en los hisopados de las bandejas, plantea dudas acerca de la correcta aplicación de los procedimientos de sanitización por parte de los operarios.

La estrategia de sanitización con NAC, si bien ofrece buenos resultados no es superior al tratamiento N°1

Del presente trabajo surge que el protocolo de sanitización N°1 (detergente e hipoclorito de sodio) a la concentración utilizada (2,5 %) fue efectiva al momento de sanitizar la superficie con la biopelícula formada *in vitro*, con un recuento menor a 10 UFC/cm², un valor que se establece como aceptable para un proceso de limpieza y desinfección de superficies según los estándares sanitarios de la Comunidad Económica Europea (Directiva L-165-48 CEE 2001), sin embargo, dicho procedimiento implica el uso de dos componentes, el detergente y el desinfectante, de modo tal que para su aplicación se requiere mayor número de pasos, en comparación con la sanitización propuesta en el tratamiento N°2 (NAC). Si bien los tiempos de aplicación de los desinfectantes fueron iguales, el proceso de sanitización del tratamiento N°1 requirió mayor tiempo de realización por su cantidad de pasos. Estos resultados plantean interrogantes para trabajos futuros como el de elaborar un plan de aplicación con distintos tiempos de aplicación, para evaluar las mejoras en la eficacia del producto. También surge la incógnita de si este nuevo producto (NAC) afecta las características organolépticas de los alimentos que se sirven en una superficie tratada con el mismo, tema que no fue objeto de este trabajo.

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

8-Anexo

Estadísticos descriptivos:							
Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	Obs. sin datos perdidos	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típica
tratamiento 1	4	0	4	0,000	1,000	0,250	0,500
tratamiento 2	4	0	4	3,000	11,000	7,250	3,304

Prueba de Mann-Whitney / Prueba bilateral:

U	0
U (estandarizado)	-2,219
Valore esperado	8,000
Varianza (U)	11,429
valor-p (bilateral)	0,027
alfa	0,05

El valor-p exacto no ha podido calcularse. Se ha utilizado una aproximación para calcular el valor-p.

Interpretación de la prueba:

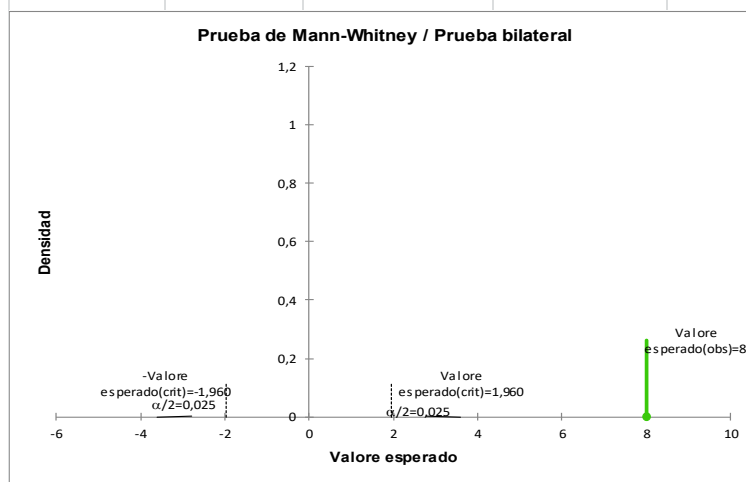
H0: La diferencia de posición entre las muestras es igual a 0.

Ha: La diferencia de posición entre las muestras es diferente de 0.

Puesto que el valor-p computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar la hipótesis nula H0, y aceptar la hipótesis alternativa Ha.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es inferior al 2,65%.

Se han detectado empates en los datos y se han aplicado las correcciones apropiadas.



Anexo N°1: Análisis descriptivo de la prueba U de Mann-Whitney

9-Bibliografía

1. Allison, D. G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A., & Gilbert, P. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS microbiology letters*, 167(2), 179-184.
2. Arnal, L. (2014). Caracterización fenotípica de *Bordetella pertussis* creciendo en biofilm (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
3. Arzu, O., Peiretti, H., Rolla, R., & Roibon, W. (2000). Evaluación de riesgo microbiológico en superficies inertes y vivas de manipuladores en áreas de producción de un supermercado del nordeste argentino. *UNNE*, 17, 6-10.
4. Aslam, S., Trautner, B. W., Ramanathan, V., & Darouiche, R. O. (2007). Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(4), 1556-1558.
5. Bassler, B. L., & Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell*, 125(2), 237-246.
6. Betancourth, M., Botero, J. E., & Rivera, S. P. (2004). Biopelículas una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia médica*, 35(3 Supl 1), 34-39.
7. Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Albiñana-Giménez, N., Maluquer de Motes Porta, C., Hundesa Gonfa, A., & Girones Llop, R. (2005). Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Revista española de salud pública*, 79(2), 253-269.
8. Borbolla-Sala, M. E., del Rosario Vidal-Pérez, M., Piña-Gutiérrez, O. E., Ramírez-Messner, I., & Vidal-Vidal, J. J. (2004). Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *Salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003. *Salud en Tabasco*, 10(2), 221-232.
9. Callejas Gómez, L. M., & Izquierdo Ordóñez, J. A. (2009). *Verificación del proceso de limpieza y desinfección de los*

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

laboratorios aguas y lodos, inmunología especializada y citometría de flujo, microbiología de alimentos y microbiología ambiental y de suelos (Bachelor's thesis).

10. Cantarero Malagón, A. S. (2010). Determinación de tensioactivos aniónicos en matrices ambientales. Comportamiento del jabón en una parcela agrícola.
11. Cervera, P., Clapés, J., & Rigolfas, R. (2001). Alimentación. McGraw-Hill. Interamericana.
12. Characklis, W. G. (1981). Bioengineering report fouling biofilm development a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(9), 1923-1960.
13. Colombia, D. (2003). Actividad bactericida del ácido hipocloroso. *Medicina*, 51(3), 136-142
14. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
15. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, HM. (1995) Microbial biofilms. In *Annual Review of Microbiology*, Vol. 49. Ornston, L.N., Barrows, A., and Greenberg, E.P. (eds). Palo Alto, CA Annu Rev Inc, pp. 711–745.
16. Dalton, H M., Goodman, A. E., & Marshall, K. C. (1996). Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria. *Journal of industrial microbiology*, 17(3-4), 228-234.
17. Davies, D.G. & Geesey, G.G. (1995) Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 61 860–867.
18. Davies, D.G., Chakabarty, A.M., Geesey, G.G. (1993) Exopolysaccharide production in biofilms substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 59 1181–1186.
19. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H, Costerton, J.W., Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280 295–298.

- Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización
20. del Carmen Montenegro-Salazar, T. (2006). Las biotoxinas marinas en los alimentos. *Revista Peruana de Obstetricia y Enfermería*, 2(2).
 21. del Rosario Aya, M., Lafaurie, G. I. I., Arboleda, S., Escalante, A., Castillo, D. M., Millán, L. V.,... & Ruiz, B. N. (2009). Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Revista Colombiana de Investigación en Odontología*, 1(1)
 22. Delgado Rastrollo, M. (2016). Estudio experimental de la eficacia de sustancias no antibióticas para la prevención y tratamiento de las infecciones asociadas a prótesis osteoarticulares producidas por "Staphylococcus spp".
 23. Díaz Caballero, A. J., Vivas Reyes, R., Puerta, L., Ahumado Monterrosa, M., Arévalo Tovar, L., Cabrales Salgado, R., & Herrera Herrera, A. (2011). Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing Una revisión. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 23(3), 195-201.
 24. Diaz, C. (2011). *Adherencia y colonización de Pseudomonas fluorescens sobre sustratos sólidos influencia de la topografía y composición química de la superficie* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas
 25. Eigen, M. (2001). Priones y encefalopatía espongiforme bovina. Prensa científica.
 26. Erch, D., & Raduán, S. (2015). Antecedentes de cómo es afectada la epidemiología de las zoonosis transmitidas por los alimentos por el cambio climático y la globalización (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción Facultad de Ciencias Veterinarias Programa de Magister en Tecnología y Seguridad de Alimentos de Origen Animal).
 27. Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A., & Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal*, 13(2), 113-117.
 28. Fernandez Boj, O. (2003). Problemática del mal de las vacas locas y consecuencias.
 29. Flemming, H C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.

- Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización
30. Garmendia, G., & Vero, S. (2006). Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Horticultura*, 197, 18-27.
 31. Gaviglio, A. (2014). *Opinión sobre salud y atención de salud del adulto mayor en el conurbano bonaerense y gran La Plata* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Médicas).
 32. Goncalves, J. (2007). Relevancia y participación de las biopelículas microbianas en las infecciones endodónticas. Recuperado el, 9.
 33. González, a. D. F. D. Estudio de la expresión de genes involucrados en la virulencia y la resistencia a la desinfección de biopelículas de listeria monocytogenes, XVI congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería, Guadalajara, México, junio 2015.
 34. Guambo, C., & Virginia, I. (2013). Elaboración de un plan de limpieza y sanitización para mejorar la calidad de productos pesqueros comercializados en el local PROMAR ubicado en la ciudad de Ambato.
 35. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32001D0471>
 36. Kopper, G., Calderón, G., Scheneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2011). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico.
 37. Lee, G., Calderón-Ubaquí, V., & Sacsquispe-Contreras, S. (2016). Bacterias en superficies contactadas durante las tomas radiográficas intraorales. *Revista Estomatológica Herediana*, 26(1), 4-12.
 38. Leotta, G. A. (2018). Microbiología aplicada a la inocuidad de los alimentos. *Anales de la ANAV*, 69.
 39. Leotta, G. A., Chinen, I., Epszteyn, S., Miliwebsky, E., Melamed, I. C., Motter, M., ... & Rivas, M. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista argentina de microbiología*, 37(1), 1-10.
 40. Martínez, M. L. O., Durán, Director, M. E. M., Pacheco, O. E., Bonilla, H. Q., Guerrero, J. A., Villarreal, Á. E. F., ... & Montaña, L. A. (2016). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Colombia: INS, 1-69.
 41. Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol*, 182, 6482-6489 Tuomi.

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

42. Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current opinion in biotechnology*, 14(3), 255-261.
43. Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology*, 17(2), 73-87.
44. Mora Collazos, A., & Bravo Montano, E. (2017). Bacterial Diversity Associated with Anodic Biofilms in Microbial Fuel Cells Fed with Wastewater. *Acta Biológica Colombiana*, 22(1), 77-84.
45. Mylonakis, E., Hohmann, E. L., & Calderwood, S. B. (1998). Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine*, 77(5), 313-336.
46. Navia, d. p., Villada, h s., & Mosquera, s. a. (2010). las biopelículas en la industria de alimentos biofilms in the food industry biofilmes na indústria de alimentos. *surfaces*, 8(2), 119.
47. Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, 67(1), 161-172.
48. Neira González, M. (2003). En qué dirección va la seguridad alimentaria. *Revista española de salud pública*, 77(3), 307-311.
49. NIH <https://salud.nih.gov/articulo/luche-contra-la-intoxicacion-alimentaria/>
50. Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A., & García, M. (2012). Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Revista chilena de infectología*, 29(5), 504-510.
51. Ossa, J., Coral, A., & Vanegas, M. (2010). Microbiota de jamones de cerdo cocidos asociada al deterioro por abombamiento del empaque. *Revista MVZ Córdoba*, 15(2).
52. O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 30(2), 295-304.
53. Parra Trujillo, M. H, Peláez Suárez, L., Londoño Arango, J. E., Pérez Almario, N., & Rengifo Benítez, G. (2003). Los residuos de medicamentos en la leche. Problemática y estrategias para su control.

- Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización
54. Perez-Giraldo, C., Rodriguez-Benito, A., Moran, F. J., Hurtado, C., Blanco, M. T., & Gomez-Garcia, A. C. (1997). Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 39(5), 643-646.
 55. Pinillos, M. A., Gómez, J., Elizalde, J., & Dueñas, A. (2003). Intoxicación por alimentos, plantas y setas. In *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 26, pp. 243-263). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
 56. Psaltis, A. J., Ha, K. R., Beule, A. G., Tan, L. W., & Wormald, P. J. (2007). Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 117(7), 1302-1306.
 57. Quindós, G., Villar-Vidal, M., & Eraso, E. (2009). Actividad de la micafungina contra las biopelículas de *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(1), 49-55.
 58. Rodriguez Herazo, M. D. M. (2016). Aplicación de la norma nte-inen 2458: 2008 al personal operativo de un Restaurante de primera categoría mediante un programa de Capacitación.
 59. Román, M., & Tirado, S. (2004). Evaluación de la formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas spp.* en empaques utilizados en la industria de alimentos. *Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, DC.*
 60. Rossi, M. L., Paiva, A., Tornese, M., Chianelli, S., & Troncoso, A. (2008). Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Revista chilena de infectología*, 25(5), 328-335.
 61. Sanna, A. (2016). Desarrollo de un programa de capacitación en higiene alimentaria para comedores institucionales.
 62. Schneider, R. P., & Marshall, K. C. (1994). Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces—effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films. *Colloids and surfaces B Biointerfaces*, 2(4), 387-396.

Evaluación de la biodiversidad de una biopelícula aislada a campo y su respuesta a distintas estrategias de sanitización

63. Sottile, F. D., Marrie, T. J., Prough, D. S., Hobgood, C. D., Gower, D. J., Webb, L. X., ... & Gristina, A. G. (1986). Nosocomial pulmonary infection possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes. *Critical care medicine*, 14(4), 265-270.
64. Vega, P. V., & Florentino, B. L. (1991). Toxicología de alimentos. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.
65. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487.
66. Zhao, T., & Liu, Y. (2010). N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC microbiology*, 10(1), 140.