



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al
título de DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Estudio del comportamiento de biopelículas bacterianas desarrolladas sobre distintas superficies de contacto y sometidas a diferentes temperaturas. Desarrollo de una metodología de control “*in situ*”

AUTOR: COPES, Julio Alberto

DIRECTOR: CERDÁ, Raúl

LUGAR DE TRABAJO :

Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata.

Comedor Universitario. Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Moredo, Fabiana

Dra. Rodriguez, Maria de las Nieves

Dra. Hugo, Ayelen

2019

Este trabajo está dedicado a:

Male, porque me hizo volver a vivir.

Juan y Tomás, porque son el orgullo de mi vida.

Isa porque creo en vos.

A los que están de gira:

Mi viejo, mi vieja y Mariel.

AGRADECIMIENTOS:

A la UNLP que desde 1975 me educó, me ayudó a crecer, me hizo veterinario, me escuchó los gritos y también me aconsejó. Aprendí el sentimiento de pertenencia y estoy excesivamente orgulloso de sus cimientos: irrestricta, gratis y pluralista.

A mi Facultad, que me hizo creer que ser veterinario no es una profesión, es un sentimiento!

Al Comedor Universitario que siempre estuvo presente con alma, corazón y garra en el momento más difícil de mi vida. Mi reconocimiento infinito...

A Karina, por todo y más...

A los amigos Julián, Diego y Leandro.

A todes les chiques de la Cátedra: Yiye, Rafa, Leo, Tato y Toy.

A Raúl, por haber estado ahí cuando lo necesité.

A Pía, por ayudarme y haber sido tan amable.

A Flor Pantozzi, porque me aguantás desde hace 30 años.

A les chiques de posgrado.

A Yayo Carullo, por estar en los momentos difíciles y poner a mi disposición todo lo que necesitaba.

A les trabajadores del comedor que llevaron al éxito semejante empresa y con ellos ganamos mas de 12 mil batallas!!!

A los que creyeron que podía... Pato Nosetto, Pato Llorente, Raúl Perdomo y Fernando Tauber.

*Remontar el barrilete en esta tempestad
sólo hará entender que ayer no es hoy
que hoy es hoy
y que no soy actor de lo que fui*

Divididos

Índice.....	IV
Figuras.....	XI
Formulas y ecuaciones.....	XI
Fotos.....	XI
Gráficos.....	XII
Tablas.....	XIII
Abreviaturas y Símbolos.....	XVI
Resumen.....	XIX
Summary.....	XXI

Índice

Introducción

Enfermedades Transmitidas por Alimentos	2
i. Definición.....	2
ii. Multicausalidad	4
iii. Síntomas	7
iv. Estrategias de control	8
v. Contaminación de superficies y cruzada	9
Biopelículas.....	11
i. Definición.....	12
ii. Estructura	14
iii. Formación	15
iv. Cinética celular	19
v. Características de la matriz que influye en la formación de biopelículas	20
vi. Tipos de superficies empleadas en la Industria alimentaria ..	23
vii. Comunicación entre células (<i>Quorum Sensing</i>)	24

viii.	Otras propiedades que influyen en la formación y desarrollo de las biopelículas. Movimientos bacterianos	27
ix.	Intercambio genético	29
x.	Métodos de estudios utilizados	30
Biopelículas y su repercusión en la Industria Alimentaria.....		32
i.	Limpieza – Desinfección (LD).....	33
ii.	Desinfección	38
iii.	Plan de acción para la implementación de la LD	40
iv.	El hipoclorito de sodio, el agua electroactivada y el ácido acético como agentes desinfectantes	42
v.	Control en superficies de contacto con los alimentos. Marco legal	45
vi.	La importancia del estudio de biopelículas en superficies en contacto con alimentos y del desarrollo de protocolos de higiene en el Comedor Universitario de la Universidad Nacional de La Plata	59

Contenido

Objetivo General	51
Objetivos específicos	51

ETAPA 1

Formación de biopelículas en superficies de bandejas, contenedores de plástico y tablas de corte. Investigación de *E. coli* O157, *Salmonella* spp, *Listeria* spp, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Recuento de mesófilos aerobios totales (RAM).

Objetivo	55
Materiales y Métodos.....	56

i.	Superficies a estudiadas	56
ii.	Método de tinción para la detección de biopelículas	57
iii.	Muestreo para el estudio microbiológico	58
iv.	Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (RAM).....	59
a.	Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp	60
b.	Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	61
c.	Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> O157.....	61
d.	Aislamiento e identificación de <i>P. aeruginosa</i>	62
e.	Aislamiento e identificación de <i>Listeria</i> spp.	63
	Resultados.....	64
i.	Detección de biopelículas a través de cristal violeta	64
ii.	Recuentos de Aerobios Mesófilos (RAM)	64
iii.	Análisis microbiológicos de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Salmonella</i> spp y <i>Listeria</i> spp.	69
	Discusión.....	70
	Conclusiones parciales.....	73

ETAPA 2

Velocidad de formación de biopelículas de cinco cepas bacterianas y sanitización a diferentes temperaturas y superficies.

	Objetivo	75
	Materiales y Métodos.....	76
i.	Superficies a estudiadas	76
ii.	Aislamientos bacterianos utilizados para el bioensayo	76
iii.	Preparación de cada inóculo	77
iv.	Preparación de bioensayos	78

v.	Toma de muestra y procesado	80
vi.	Método de cuantificación de bacterias viables	82
vii.	Método de tinción	82
viii.	Resumen de la toma de muestra y procesado de las superficies con biopelículas	83
ix.	Modelado Matemático del desarrollo Microbiano. Modelo de Gompertz	84
x.	Análisis estadístico	86
xi.	Aplicación de protocolos de limpieza y desinfección (LD)	86
xii.	Obtención de biopelículas destinadas para aplicar los 3 protocolos de LD. Concentraciones y tiempos de formación..	86
	a. Protocolos de Limpieza y Desinfección propuestos.....	90
	b. Aplicación de la LD “ <i>in vitro</i> ”.....	91
	Resultados.....	95
i.	Aplicación de la LD “ <i>in vitro</i> ”	95
	a. Incubación a 3°C para <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. ..	95
	b. Incubación a 3°C para <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp.	99
	c. Incubación a 10°C para <i>P. aeruginosa</i> , <i>Listeria</i> spp, <i>E.coli</i> , <i>E.coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp.	104
	d. Incubación a 25°C para <i>P. aeruginosa</i> , <i>Listeria</i> spp, <i>E.coli</i> , <i>E.coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp... ..	119
ii.	Aplicación de la ecuación de Gompertz a los datos experimentales.	114
	a. <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp a 3°C, incubadas 192 horas.	114
	b. <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp. a 3°C.	117

c.	<i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Listeria</i> spp, <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> spp. a 10°C.	119
d.	<i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Listeria</i> spp, <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> spp. a 25°C.	120
e.	Comparación de los modelados de <i>E. coli</i> a tres temperaturas en Al.	124
iii.	Tinciones de superficies	125
a.	<i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp	126
b.	<i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp.	126
c.	<i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Salmonella</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. a 10°C.	127
d.	<i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Salmonella</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. a 25°C.	127
iv.	Aplicación de protocolos de LD	131
a.	Protocolo 1	131
b.	Protocolo 2.	134
c.	Protocolo 3	136
	Discusión.....	140
i.	Desarrollo de biopelículas	140
ii.	Método de tinción para la detección de biopelículas	150
iii.	Aplicación de tres protocolos LD	150
	Conclusiones parciales	154

ETAPA 3

Aplicación y verificación “*in situ*” (Comedor Universitario) del protocolo de sanitización elegido “*in vitro*”.

Objetivo	157
----------------	-----

Materiales y Métodos.....	158
i. Toma de muestras	158
ii. Estudios microbiológicos	159
iii. Diagrama de flujo de las bandejas de servicio, contenedores de PEAD y tablas de PTFE en el comedor Universitario de la UNLP.....	160
a. Diagramación del lavado y desinfección de bandejas de servicio según la disposición de piletas.	1632
b. Diagramación del lavado y desinfección de contenedores de PEAD.	162
c. Acción correctiva aplicada en el lavado y desinfección de los contenedores de PEAD.....	164
d. Diagramación del lavado y desinfección de tablas de PTFE según la disposición de piletas.	165
e. Ubicación de los lugares de lavado en el plano del Comedor Universitario calle 50 sede 1 Bosque Oeste.	166
Resultados.....	168
i. Análisis bacteriológicos en superficies de Al	168
ii. Análisis bacteriológicos en contenedores de PEAD	168
iii. Análisis bacteriológicos en tablas de PTFE.	169
Discusión.....	172
i. Acero Inoxidable	173
ii. PEAD.....	174
iii. PTFE.	176
Conclusiones parciales.....	178

Conclusiones finales	180
Bibliografía	184

FIGURAS.

Figura 1: Multicausalidad de las ETA	4
Figura 2: Triada epidemiológica.....	5
Figura 3: Etapas en el desarrollo de las biopelículas.	1919
Figura 4: <i>Quorum sensing</i> en bacterias Gram negativas (a) y Gram positivas (b)	277
Figura 5: <i>Swarming</i> en medio de cultivo sólido.	29
Figura 6: Mecanismo de acción de los detergentes.	377
Figura 7: Preparación de soluciones de hipoclorito de sodio	433
Figura 8: Obtención y procesado de la muestra de la superficie con biopelícula.	811
Figura 9: Resumen del proceso completo (toma de muestra, procesado de superficies y tinción).....	833
Figura 10: Diagrama de flujo de bandejas de servicio, contenedores de PEAD y tablas de PTFE.	1611
Figura 11: Diagramación del lavado y desinfección de bandejas de Al	1633
Figura 12: Diagramación del lavado y desinfección de contenedores de PEAD	1644
Figura 13: Modificación del flujo operativo a partir de la desinfección de PEAD	1655
Figura 14: Diagramación del lavado y desinfección de tablas de PTFE según la disposición de piletas en el Comedor Universitario.	1666
Figura 15: : Ubicación de los lugares de lavado en el plano del Comedor Universitario calle 50 sede 1 Bosque Oeste	1677
Figura 16: Límites en autocontrol y m.....	1733

FÓRMULAS

Fórmula 1: Recuento de unidades formadoras de colonias en superficie.....	59
Ecuación 1: Ecuación modificada de Gompertz.....	84

FOTOS

Foto 1: <i>Listeria monocytogenes</i> en rugosidades del acero inoxidable	222
Foto 2: Bandeja de Al.	566
Foto 3: Contenedor de PEAD.	566
Foto 4: Tabla de PTFE.....	566
Foto 5: Tinción positiva con cristal violeta al 1 % en Al (bandeja de servicio).	578
Foto 6: Cortes de Al (a), PEAD (b) y PTFE (c).	766
Foto 7: Tubos 22 mm con LB, conteniendo superficies de Al listos para incubar.....	800
Foto 8: Impronta de la superficie cultivada en medio sólido.....	81

Foto 9: Biopelícula en de <i>P. aeruginosa</i> (36 horas de incubación a 25°C).....	89
Foto 10: Biopelícula en AI de <i>E. coli</i> O157 (96 horas de incubación a 10°C).....	89
Foto 11: Biopelícula en AI de <i>Salmonella</i> spp. (96 horas de incubación a 10°C).....	89
Foto 12: Ubicación de los materiales para la extracción de la superficie.....	922
Foto 13: Humectado y cepillado en contenedor plástico con la solución detergente.....	933
Foto 14: Enjuagado en los vasos con agua potable estéril, durante 30 segundos.....	933
Foto 15: Secado con papel absorbente dentro de la cabina de bioseguridad.....	933
Foto 16: Secado con papel absorbente dentro de la cabina de bioseguridad.....	944
Foto 17: Toma de muestra con 2 hisopos en caldo Lethen.....	944
Foto 18: Superficies de AI, a) sin coloración, b) tinción difusa y c) tinción total de la superficie.....	1255
Foto 19: Superficies de PEAD, a) sin coloración, b) tinción difusa y c) tinción total de la superficie.....	1255
Foto 20: Superficies de PTFE, a) sin coloración, b) tinción difusa y c) tinción total de la superficie.....	1255

GRÁFICOS

Gráfico 1: Valores de RAM en Log UFC/cm ² obtenidos a partir de hisopados en (a) AI, (b) PEAD, (c) PTFE.....	688
Gráfico 2: Valores obtenidos a partir de los recuentos de <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. en AI (a), PEAD (b) y PTFE (c) a 3°C.....	977
Gráfico 3: Valores obtenidos a partir de los recuentos de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp y <i>E. coli</i> O157 en (a) AI, (b) PEAD y (c) PTFE a 3°C.....	1033
Gráfico 4: Valores obtenidos a partir de los recuentos de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Listeria</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> spp. en AI (a), PEAD (b) y PTFE (c) a 10°C.....	1077
Gráfico 5: Valores obtenidos a partir de los recuentos de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Listeria</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> spp. en AI (a), PEAD (2) y PTFE (c) a 25°C.....	1122
Gráfico 6: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para <i>P. aeruginosa</i> en AI (a), <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. en PEAD (b) y <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. en PTFE (c) incubadas a 3°C.....	1166
Gráfico 7: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para <i>E. coli</i> en AI (a), <i>E.coli</i> y <i>Salmonella</i> spp en PEAD (b) y <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> O157 en PTFE (c) a 3°C.....	1188
Gráfico 8: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Listeria</i> spp. y <i>Salmonella</i> spp. en AI (a), PEAD (b) y <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp. PTFE (c) a 10°C en AI.....	1211

Gráfico 9: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Listeria</i> spp. y <i>Salmonella</i> spp en AI (a), <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>P. aeruginosa</i> en PEAD (b) y <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> O157 a 25°C.	1233
Gráfico 10: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para <i>E. coli</i> a tres temperaturas, en la misma superficie (AI) incubada durante 240 horas.	1244
Gráfico 11: Valores en UFC/cm ² obtenidos en superficies de AI en 100 muestras, post aplicación del protocolo 1.....	1700
Gráfico 12: Valores en UFC/cm ² obtenidos en superficies de PEAD en 50 muestras, post aplicación del protocolo 1 (hasta el valor rojo) y protocolo 1 modificado (después del valor rojo).	1700
Gráfico 13: valores en UFC/cm ² obtenidos en superficies de PTFE en 50 muestras, post aplicación del protocolo 1.....	1700
Gráfico 14: Promedio diario UFC/cm ² en superficies de AI (a), PEAD (b) y PTFE (c) post aplicación del protocolo 1 y del protocolo 1 modificado.	171

TABLAS

Tabla 1: Resultados de los RAM de las 20 muestras de AI.	655
Tabla 2: Resultado de los RAM de las 20 muestras de PEAD.....	666
Tabla 3: Resultado de los RAM de las 20 muestras de tablas de PTFE.....	677
Tabla 4: Resumen de la metodología utilizada para los bioensayos con las 5 cepas bacterianas en 3 superficies y en las tres temperaturas de incubación.	79
Tabla 5: Concentraciones y tiempos de incubación de las cinco cepas donde se obtuvo el mayor recuento bacteriano.	877
Tabla 6: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 192 h de incubación sobre AI, de <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp aplicando la fórmula 1.	955
Tabla 7: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 192 h de incubación sobre PEAD, de <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp aplicando la fórmula 1.....	966
Tabla 8: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 192 h de incubación sobre PTFE, de <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp aplicando la fórmula 1.....	96
Tabla 9: Comparación de los valores promedios de concentración bacteriana (log UFC/cm ²) de <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. a diferentes tiempos de lectura para las tres superficies estudiadas (AI, PEAD, PTFE) incubadas a 3°C.....	988
Tabla 10: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 240 h de incubación sobre AI, de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp. aplicando la fórmula 1..	99
Tabla 11: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 240 h de incubación sobre PEAD de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp. aplicando la fórmula 1.	1000

Tabla 12: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 240 h de incubación sobre PTFE de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp. aplicando la fórmula 1.	1011
Tabla 13: Comparación del promedio de la concentración de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp. (UFC/cm ²) incubados a 3°C y en 3 superficies.	1011
Tabla 14: Resultados de la comparación de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp. incubados a 3°C y en 3 superficies.	1022
Tabla 15: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 192 h de incubación sobre AI de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. aplicando la fórmula 1.	1042
Tabla 16: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 192 h de incubación sobre PEAD de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. aplicando la fórmula 1.	1054
Tabla 17: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 192 h de incubación sobre PTFE de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. aplicando la fórmula 1.	1066
Tabla 18: Comparación de los valores promedios de concentración bacteriana (log UFC/cm ²) a diferentes tiempos de lectura para las tres superficies estudiadas, incubadas a 10°C.	1087
Tabla 19: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 72 h de incubación sobre AI de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. aplicando la fórmula 1.	109
Tabla 20: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 72 h de incubación sobre PEAD de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. aplicando la fórmula 1.	110
Tabla 21: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²) obtenidos en 72 h de incubación sobre PTFE de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. aplicando la fórmula 1.	1111
Tabla 22: Comparación de los valores promedios de concentración bacteriana (log UFC/cm ²) a diferentes tiempos de lectura para las tres superficies estudiadas incubadas a 25°C.	1133
Tabla 23: Parámetros derivados de la ecuación de Gompertz obtenidos del promedio de los recuentos de <i>P. aeruginosa</i> y <i>Listeria</i> spp. a 3°C y en AI, PEAD y PTFE.	115
Tabla 24: Parámetros derivados de la ecuación de Gompertz obtenidos del promedio de los recuentos de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157 y <i>Salmonella</i> spp. a 3°C y en AI, PEAD y PTFE.	1177
Tabla 25: Parámetros derivados de la ecuación de Gompertz obtenidos del promedio de los recuentos de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Listeria</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> spp. a 10°C y en AI, PEAD y PTFE.	119

Tabla 26: Parámetros derivados de la ecuación de Gompertz obtenidos del promedio de los recuentos de <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Listeria</i> spp, <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> spp. a 25°C.	1222
Tabla 27: Resultado de la tinción de superficie a 3°C.	1266
Tabla 28: Resultado de la tinción de superficie a 3°C.	1277
Tabla 29: Resultado de la tinción de superficie a 10°C.	1288
Tabla 30: Resultado de la tinción de superficie a 25°C.	129
Tabla 31: Vista general de las 4 tablas con la lectura de superficie hasta las 48 horas.	130
Tabla 32: Resumen del porcentaje de categorías según la temperatura de incubación.	1300
Tabla 33 : Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 1 en AI, PEAD y PTFE a 3°C.	1311
Tabla 34: Resultados obtenidos en los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 1 en AI, PEAD y PTFE a 10°C.	1322
Tabla 35: : Resultados obtenidos en los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 1 en AI, PEAD y PTFE a 25°C.	1333
Tabla 36: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 2 en AI, PEAD y PTFE a 3°C.	1344
Tabla 37: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 2 en AI, PEAD y PTFE a 10°C.	1355
Tabla 38: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 2, en AI, PEAD y PTFE a 25 °C.	1366
Tabla 39: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 3 en AI, PEAD y PTFE a 3°C.	1377
Tabla 40: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 3, de AI, PEAD y PTFE a 10°C.	1388
Tabla 41: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 3 en AI, PEAD y PTFE a 25°C.	13939
Tabla 42: Valores de los RAM en la Etapa 1 y protocolo 1 en superficies de AI.	1733
Tabla 43: Valores obtenidos en los RAM en la Etapa 1, protocolo 1 y protocolo 1 modificado en superficies de PEAD.	1766
Tabla 44: Valores obtenidos en RAM en la Etapa 1 y protocolo 1 en superficies de PTFE.	1778

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Acero Inoxidable	AI
Ácido Clorhídrico	HCL
Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Acil-homoserina-lactonas	AHLs
Administración de Alimentos y Drogas (<i>Food and Drugs Administration</i>)	FDA
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica	ANMAT
Agar Trypticase Soya	TSA
Agar-hierro-triple azúcar	TSI
Agar recuento en placa	ARP
Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control	HACCP
Asociación Americana de Salud Pública	APHA
Buenas Prácticas de Manufactura	BPM
Código Alimentario Argentino	CAA
Caldo Luria Bertami	LB
Caldo Mueller Kauffman <i>Tetrationato</i> novobiocina	MKKTa
Caldo Triptona soya modificado	TSBm
Centímetro cuadrado	cm ²
Centro de Control de Enfermedades	CDC
Centro de Ingeniería de biopelículas (<i>Center for Biofilm Engineering</i>)	CBE
Comité de selección de sustancias Gras (<i>Select Committee on GRAS Substances</i>)	SCROGS
Comunidad Europea	CE
Concentración de iones de hidrógeno presentes en determinadas disoluciones.	pH
Criterio de Higiene de los Procesos	CHP
Dosis Infecciosa Mínima	DIM
Duración de la fase de latencia	LPD
<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	STEC
Enfermedades Transmitidas por Alimentos	ETA
Especie	Spp.
Facultad de Ciencias Veterinarias	FCV
Gen <i>LuxI</i> responsable de la síntesis de L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL),	LuxI
Gen <i>LuxR</i> regulador del <i>quorum-sensing</i>	LuxR
Gen <i>rfb</i> O157	rfb O157
Generalmente reconocido como seguro	GRAS

Grados centígrados	°C
Hidrón o catión hidrógeno	H+
Horas	H
Instituto americano del hierro y el acero	AISI
Instituto Nacional de Alimentos	INAL
Limpieza en el lugar (<i>Clean in place</i>)	CiP
Limpieza y Desinfección	LD
Lipopolisacáridos	LPS
Logaritmo	Log
Máxima densidad poblacional microbiana	MPD
Mayor a	>
Mc Conkey sorbitol Cefixime Telurito	CT-SMAC
Medio de Lisina y hierro	LIA
Medio Eosina Azul de Metileno	EMB
Menor a	<
Microlitro	μl
Micromolar	mM
Mililitros	ml
Milímetro	mm
Milivoltios	mV
Ministerio de Salud y Acción Social	MS y AS
Nanómetro	Nm
Operador Empresa Alimentaria	OEP
Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación	FAO
Organización Internacional de Epizootias	OIE
Organización Internacional de Normalización	ISO
Organización Mundial de la Salud	OMS
Organización Panamericana de la Salud	OPS
Partes por millón	Ppm
Policloruro de vinilo	PVC
Polietileno de alta densidad	PEAD
Prueba de Christie-Atkins-Munch-Peterson	CAMP
<i>Quorum Sensing</i>	QS
Politetrafluoroetileno	PTFE
<i>Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone</i>	RVS
Reacción en Cadena de la Polimerasa	PCR
Recuento de Aerobios Mesófilos	RAM
Segundos	Seg

Servicio Agrícola Ganadero Chile	SAG
Servicio de Inspección Veterinaria	SIV
Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria	SENASA
Sistema accesorio de regulación de genes	Agr
Solución Fisiológica	SF
Sub unidad proteica de las fibras <i>Curly</i>	CsgA
Sustancias Poliméricas Extracelulares	EPS
Teoría Derjaguin, Landau, Verway y Overbeek	DLVO
Toxinas Shiga	STX
Tris edta buffer	TE
Unidad Formadora de Colonias	UFC
Unión Europea	UE
Unión Internacional de Química Pura y Aplicada	IUPAC
Universidad Nacional de La Plata	UNLP
Valor p	P
Velocidad específica de crecimiento	μ
<i>Xilosa, Lisina, Decarboxilasa</i>	XLD
<i>Xylose-Lysine-Tergitol 4</i>	XLT4

Estudio del comportamiento de biopelículas bacterianas desarrolladas sobre distintas superficies de contacto y sometidas a diferentes temperaturas. Desarrollo de una metodología de control “*in situ*”.

Palabras Clave: Biopelículas, Cristal Violeta, Limpieza, Desinfección, Hipoclorito de sodio, acción correctiva.

RESUMEN Con el fin de evaluar el comportamiento de la formación de biopelículas bacterianas en diferentes superficies y temperaturas para a su control, se desarrolló la presente investigación en tres etapas. **ETAPA UNO:** su objetivo fue la detección de biopelículas sobre superficies de acero inoxidable (AI), polietileno de alta densidad y alto peso molecular (PEAD) y politetrafluoroetileno (PTFE); recolección de muestras para el recuento de mesófilos aerobios (RAM) e investigación de patógenos. La identificación de biopelículas se realizó utilizando la tinción de cristal violeta. El color azul se observó en el 15% de la superficie en AI, en el 35% en PEAD y 40% en PTFE. Los hisopados de los lugares coloreados mostraron una alta concentración bacteriana. Se aisló una cepa de *E. coli* (no productora de Toxina Shiga) y una cepa de *P. aeruginosa* a partir de superficies de PEAD. No se aislaron bacterias patógenas. Todos los RAM superaban los límites microbiológicos recomendados. En la **ETAPA DOS** se evaluó el desarrollo (*in vitro*) de biopelículas en tres superficies y tres temperaturas (3, 10 y 25°C). Se aplicaron tres protocolos de limpieza y desinfección (LD) (*in vitro*) a las biopelículas maduras. Cada LD fue evaluado por medio de recuento bacteriano de superficie. Para el

desarrollo de biopelículas se utilizaron las cepas aisladas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y cepas de origen externo de *E. coli* O157, *Listeria* spp y *Salmonella* spp. Las cinco cepas produjeron biopelículas en todas las superficies y en las tres temperaturas, superando las dosis infectivas mínimas de cada patógeno utilizado. A 3°C *Listeria* spp. mostró el mayor recuento (3,08 log UFC/cm²) y no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con *P. aeruginosa* en 192 horas de incubación. En *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. se observaron diferencias significativas para *E. coli* ($p < 0,05$). A 10 y 25°C *E. coli* O157 mostró los valores más altos con 6,20 log UFC/cm² (192 horas) y 7,92 UFC/cm² (72 horas) respectivamente. En cada temperatura se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre cada cepa. A las biopelículas con mayor recuento de bacterias se aplicaron los protocolos de LD. 1) detergente neutro e hipoclorito de sodio, 2) catolito y agua electroactivada y 3) detergente alcalino y ácido acético. Los tres protocolos fueron efectivos y cumplieron con los límites microbiológicos recomendados y con los obligatorios. El protocolo elegido de LD para experimentar in situ fue el 1. En la **ETAPA TRES** se evaluó la aplicación del protocolo 1 de LD *in situ*. Fue altamente efectivo en AI y PTFE. En PEAD, dos resultados igualaron el límite de RAM recomendado y se implantó una acción correctiva denominada Protocolo 1 modificado. En PEAD el Protocolo 1 modificado cumplió con los límites microbiológicos recomendados y obligatorios. El trabajo realizado generó una importante información que permitió obtener herramientas para aplicar mejoras en forma continua, profundizar en el

estudio de identificación y control de biopelículas y trabajar de manera multidisciplinaria en estrategias de capacitación de operarios con un solo objetivo: **producir alimentos seguros para la comunidad universitaria.**

Study of the behavior of bacterial biofilms grown on different contact surfaces and subjected to different temperatures. Development of an “*in situ*” control methodology.

Key words: biofilms, crystal violet, cleansing, disinfection, sodium Hypochlorite, corrective action.

SUMMARY. In order to evaluate the behavior of bacterial biofilm growth, in different surfaces and temperatures, the present investigation was made in three stages. **STAGE ONE**, its purpose was the detection of biofilms on stainless steel surfaces (SS), high density and high molecular weight polyethylene (HDPE) and polytetrafluorethylene (PTFE); sample recollection for the aerobic mesophilic total plate count (APC) and pathogen research. The identification of biofilms was conducted by crystal violet dyeing, color blue was observed in 15% of the SS surface, in the 35% in HDPE and 40% on PTFE. Swabs from the colored places show a high bacterial concentration. A strain of *E. coli* was isolated (not a Shiga toxin producer) as well as another one of *P. aeruginosa* on HDPE surfaces. No pathogenic bacteria were isolated. All APC were over the recommended microbiological limits. On **STAGE TWO** the development *in vitro* of biofilms on three surfaces and three temperatures was evaluated (3, 10 y 25°C). Three cleaning and disinfection protocols (CD) were

applied (*in vitro*) to the mature biofilms. Each CD was evaluated through surface bacteria count. For the development of biofilms isolated strains were used (*E. coli* and *P. aeruginosa*) and external source strains of *E. coli* O157, *Listeria* spp and *Salmonella* spp. All five strains produced biofilms on all surfaces and at the three temperatures, exceeding the minimum infective dose of each of the used pathogens. At 3°C *Listeria* spp showed the highest count (3,08 log UFC/cm²) and no significant differences were observed (p>0,05) with *P. aeruginosa* after 192 hours of incubation. In *E. coli*, *E. coli* O157 and *Salmonella* spp, significant differences were observed for *E. coli* (p<0,05). At 10 y 25°C *E. coli* O157 showed the highest values with 6,20 log UFC/cm² (192 hours) and 7,92 UFC/cm² (72 hours) respectively. At each temperature, significant differences were observed (p<0,001) between each strain. To the biofilms with higher bacteria count, the three CD protocols were applied. 1) neutral detergent and sodium hypochlorite, 2) Catholyte and electro activated water and 3) alkaline detergent and acetic acid. All three protocols were effective and achieved the recommended and the obligatory microbiologic limits. For the *in-situ* experiment, the selected CD protocol was number 1). On **STAGE THREE** the application *in-situ* of the CD protocol 1 was evaluated. It was highly effective on SS and PTFE. On HDPE, two results equalled the recommended APC limit and a corrective action named Modified Protocol 1 was implemented. On HDPE, Modified Protocol 1 kept the recommended and obligatory microbiological limits. This carried out work generated important information that provided means to the

application of continuous improvement, to deepen the study of identification and control of biofilms, and to strive multidisciplinarily for new staff training strategies with one goal: **to produce safe food for the University community.**

Introducción

Los alimentos y sus nutrientes son esenciales para llevar una vida activa y sana. No obstante, pueden causar distintos tipos de enfermedades cuando se encuentran contaminados con agentes nocivos para la salud, por lo que se debe cumplir obligatoriamente el concepto de “seguridad alimentaria” (FAO-OMS, 2018).

Éste engloba el derecho de cada individuo a tener acceso en todo momento a una suficiente cantidad de alimentos, que estén libres de peligros para garantizar la seguridad, que puedan cubrir las necesidades nutricionales y las preferencias culturales para llevar una vida sana y activa.

En respuesta a esta necesidad, el Estado junto al sector privado productor de alimentos diseñaron políticas conjuntas dirigidas a producir la cantidad de alimentos que es requerida por la población. El desarrollo de estrategias de capacitación del personal, fue una de las claves para garantizar la inocuidad y la calidad de los productos. A esto se sumó una fuerte inversión económica para la modernización de maquinaria, los sistemas de conservación y distribución de los productos. La sumatoria de todas las acciones aplicadas a la producción alimentaria, generó un mercado que ofrece suficientes alimentos de excelente calidad y con garantía de inocuidad.

Desde el año 2010, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO, *Food and Agriculture Organization*), la Organización

Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) introdujeron el concepto de “una sola salud” (*one health*) con el objetivo de controlar los riesgos sanitarios entre el hombre, los animales y medio ambiente en todas las etapas de producción de los alimentos “de la granja a la mesa” (OIE, 2019).

Enfermedades Transmitidas Por Alimentos

i. Definición

La OMS define a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) como *“el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (por ejemplo, bacterias o parásitos) o no biológicos (por ejemplo, plaguicidas o metales pesados) en cantidades tales que afecten a la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas”*.

Las ETA pueden clasificarse como infecciones, intoxicaciones y toxiinfecciones o infecciones mediadas por toxina (OPS, 2018).

Las Infecciones resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales. Por ej.: Salmonelosis, Hepatitis viral A, Toxoplasmosis etc.

Las Intoxicaciones se producen por la ingesta de alimentos con toxinas pre-formadas en la matriz alimentaria. Las toxinas pueden ser productos metabólicos de microorganismos, o de sustancias químicas incorporadas de modo accidental, incidental o intencional desde su

producción hasta su consumo. Por ej.: Botulismo, Toxina Estafilocócica o Toxinas por hongos.

Toxi-Infecciones o infecciones mediadas por toxina, resultan de la ingestión de alimentos con una cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, que son capaces de producir y liberar toxinas una vez que son ingeridos. Por ej.: Cólera (CDC 2001; Mossel y col., 2003; FDA 2012).

El explosivo crecimiento demográfico a nivel mundial generó una mayor demanda de alimentos. Según la FAO la producción de alimentos destinados a humanos y animales superó las 3 mil toneladas en el año 2013, generando así nuevas corrientes de producción, de venta y de abastecimiento en estos últimos 5 años.

La premisa fundamental de la industria alimentaria es la de emprender nuevos desarrollos para la obtención de productos diseñados para satisfacer a los consumidores en todo el mundo. Esto se observa principalmente porque cada país tiene un mercado interno y externo que satisfacer, con alimentos que cumplan con los requerimientos de calidad e inocuidad solicitados por los entes reguladores.

Las grandes diferencias en los niveles socioeconómicos de la población mundial influyen en forma punzante en la velocidad de producción y transporte. En las grandes ciudades se instalaron los sistemas de producción y distribución rápida de alimentos “soluciones rápidas a una vida rápida” y en contrapartida, en los conurbanos de estas

ciudades, la primera necesidad es de proveer “comida” a granel para solventar las necesidades nutricionales diarias de poblaciones que sufren las consecuencias de políticas no inclusivas (comedores gratuitos).

ii. Multicausalidad

No se puede atribuir la aparición de las ETA a causas individuales, sino que deben ser pensadas como producto de una multicausalidad. Una de las figuras más utilizadas para concientizar a los ciudadanos se muestra en la figura 1. Se destaca la importancia que tienen las fuentes de contaminación. Este es el primer paso donde los alimentos pueden exponerse a los agentes biológicos, químicos o físicos, o propiedad de un alimento capaz de provocar un efecto nocivo para la salud (peligros) (Codex Alimentarius, 2000).

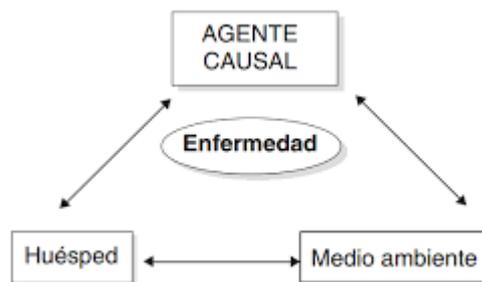
Figura 1: Multicausalidad de las ETA



Si los componentes intrínsecos de la matriz resultan ser los adecuados para que se produzca la colonización, ese alimento se transformará en un alimento vulnerable. Sumado a esto, la acción de factores extrínsecos inadecuados facilitará el desarrollo del peligro en la matriz alimentaria. Al momento de ser consumido por un huésped susceptible existe una muy alta probabilidad de que se desarrolle una ETA (ETA, 2018; Silva y col., 2015).

La tríada epidemiológica es el modelo tradicional que representó el paradigma para explicar las causas que producen enfermedades. Se compone de tres partes: un agente etiológico, un huésped susceptible y el medio ambiente que interactúa entre ambos, en especial en la vía de transmisión desde una fuente infecciosa hacia el huésped. En la medida que se rompe el equilibrio entre estos tres factores, sobreviene la enfermedad. Por otra parte, el desequilibrio de alguno de ellos puede aumentar o disminuir la frecuencia de las enfermedades (figura 2).

Figura 2: Triada epidemiológica



En el Medio ambiente: características extrínsecas (temperatura, humedad, atmósfera, etc.)

Agente etiológico: Potencial del microorganismo o tóxico para causar daño, expresión de los genes de virulencia, capacidad de evadir la respuesta inmune, sensibilidad del microorganismo al pH, etc.

Huésped: Edad, condición general de salud, estado de gravidez, alcoholismo, variación en el pH gástrico, ocupación, inmunocompetencia, etc.

Las ETA son un importante grupo de enfermedades que causan morbilidad y mortalidad en los consumidores, una estimación global publicada por la OMS (2015) informa que 31 diferentes peligros causan 32 distintas enfermedades. Once de los peligros (1 agente viral, 7 bacterias y 3 protozoos) están directamente relacionados con 11 enfermedades diarreicas, 7 enfermedades infecciosas del tipo invasivo (1 agente viral, 5 bacterias, 1 protozoo), 10 helmintos y 3 de origen químico (Pires y col., 2009).

Todos estos peligros causaron 600 millones de ETA en el año 2010, de las cuales 420 mil fueron mortales (estimaciones a nivel mundial). Las más frecuentes fueron las diarreas que provocaron (*Norovirus* o virus tipo Norwalk y *Campylobacter* spp.) 230 mil muertes, en particular *Salmonella* entérica (diarrea y enfermedad invasiva). Las otras causas fueron debidas a agentes etiológicos como *Salmonella* Thypi, *Taenia solium*, Hepatitis A y aflatoxinas (OMS, 2015).

Hasta la fecha se han descrito más de 250 tipos de ETA. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre los patógenos bacterianos se destacan: *Campylobacter*, y *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* fagotipo 104 (DT 104), STEC, *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *Yersinia* spp., *S. dysenteriae* y *Cronobacter sakazakii*. A largo plazo algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos. Un ejemplo es la infección con STEC que puede provocar el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) generando graves

complicaciones renales hasta dar como resultado final la insuficiencia renal crónica (Zotta y col, 2015; Copes y col., 2009; Leotta G, 2011).

iii. Síntomas

Los síntomas que se observan cuando se presenta una ETA pueden variar desde leves hasta graves y suelen ser diferentes según el peligro ingerido. Los más comunes incluyen malestar estomacal, cólicos estomacales, náuseas, vómitos, diarrea, fiebre, mialgias, tos, parestesias, cefaleas, visión borrosa, edemas, etc. La manifestación de los mismos puede variar en el tiempo dependiendo del peligro que haya sido ingerido. Por ejemplo, cuando se produce la ingestión de toxina estafilocócica la aparición de síntomas es muy rápida, considerada explosiva entre 2 y 6 horas (Silva y col., 2017). En el caso de que se hayan consumido alimentos contaminados con bacterias como la *Shigella* o *Salmonella*, los síntomas aparecen a partir de las 24 horas aproximadamente.

En la mayoría de las personas estas afecciones se solucionan en días, con o sin cuidado médico, pero en aquellas que por algún motivo se encuentran dentro de grupos vulnerables (niños menores de 5 años, ancianos, embarazadas, inmunocomprometidos, etc.) pueden presentar síntomas de gravedad, requerir hospitalización, causar problemas de salud a largo plazo o incluso la muerte (Silva y col., 2017; Repetto H., 2005; Boletín Integrado de Vigilancia, 2018).

iv. Estrategias de control.

La constante evolución en los procedimientos de fiscalización generó nuevas metodologías en la aplicación de controles bromatológicos en todos los niveles de producción. La necesidad de implementar los sistemas de gestión a todo nivel, originó una nueva tecnología que identifica, evalúa y realiza un tamizaje de los riesgos en la industria alimentaria. Este sistema se denominó “Inspección Basada en Riesgos” y responde en forma proactiva a las preguntas sobre el qué, el cuándo y el cómo inspeccionar. Dando prioridad a los elementos con alta probabilidad y consecuencia de contaminación (elementos de alto riesgo), esta estrategia permite una inversión racional de los recursos de inspección y mantenimiento (Hernández Arango P., 2012).

En los últimos tiempos la implementación del análisis de los riesgos ha cobrado gran notoriedad. Esto fue posible por la capacitación continua en todos los niveles, generando un mejor entendimiento de cómo suceden las enfermedades transmitidas por alimentos. El “nuevo enfoque” se está convirtiendo en la base para las medidas de prevención de las ETA (Carrasco y col., 2009).

El control de factores tales como la contaminación cruzada, cocción, pasteurización, calidad del agua, control de plagas, sanitización, personal capacitado, etc., es excluyente para reducir la carga microbiana a los niveles requeridos para garantizar la inocuidad (FAO, 2008).

Con el objetivo de lograr alimentos inocuos y con la calidad requerida, es fundamental que los establecimientos elaboradores implementen las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y los Procedimientos Operacionales Estandarizados de Sanitización (POES). Tanto las BPM como los POES son indispensables para la aplicación del sistema de Análisis de los Peligros y Puntos Críticos de Control (*HACCP, Hazard Analysis and Critical Control Points*).

Este sistema de gestión de la inocuidad (HACCP) está instalado en todo el mundo y de hecho, casi la totalidad de los países tienen fundamentadas sus auditorías oficiales en los principios del HACCP. Estas se basan en todo lo que incumbe a los procesos de producción, desde la recepción de la materia prima hasta el producto terminado. Algunos de los puntos de relevancia en la inspección son el manejo y disponibilidad de la documentación, el funcionamiento de los equipos, parámetros de control de los puntos críticos, los resultados microbiológicos y fisicoquímicos de muestras, la estrategia de capacitación del personal, etc. Terminada la auditoría, se reúne toda la información, se realizan los procesos de evaluación y se extiende el resultado. (ISO 22000 2005; OPS, 2015).

v. Contaminación de superficies y contaminación cruzada

Según la OMS, estudios realizados sobre las fuentes de contaminación de alimentos determinó que en el 25% de los casos evaluados, la contaminación cruzada fue la responsable de los brotes de

ETA en Europa (Kusumaningrum y col., 2003; Fuster i Valls N, 2006). La contaminación cruzada es la transmisión de microorganismos de un alimento contaminado a otro que no va a requerir ningún tipo de modificación tecnológica (cocción, pasteurización, esterilización, etc.) (OPS-OMS, 2016). En la página web de Alimentos Argentinos (2018) figuran otros peligros (no sólo los microorganismos) tales como los físicos (fragmentos de esponjas metálicas, vidrios, plásticos, palillos, remaches, etc.) y los de origen químico (fertilizantes, plaguicidas, desinfectantes, detergentes, combustibles, etc.) (Márquez Lara D., 2008).

En la contaminación cruzada se puede observar claramente que hay dos formas en que los peligros “viajan” de un alimento a otro; la contaminación cruzada directa es la transferencia por contacto de un alimento a otro, o porque las secreciones de un alimento contactan a otro y de esa manera lo contaminan. Un ejemplo muy conocido es cuando se exhiben para la venta alimentos crudos junto a los alimentos cocidos (SENASA, 2016).

Por otro lado, la contaminación cruzada indirecta es aquella en la que el agente contaminante se transfiere de un alimento a otro mediante algún elemento, como las manos, utensilios, tablas, equipos de cocina, etc. Uno de los ejemplos más comunes es cuando en una cocina se utiliza el mismo cuchillo para cortar carne cruda y fraccionar una tarta cocida (Keskinen y col., 2008; Jiménez Martínez F, 2014; Mazengia y col., 2015).

Al producirse el contacto cruzado indirecto (fuente de contaminación a superficie) es muy factible que permanezcan restos orgánicos en las zonas de contacto o que la superficie ya tenga restos orgánicos. Esto puede comportarse como un nicho ecológico para el desarrollo de microorganismos que pueden organizarse y formar biopelículas. Estas biopelículas pueden estar conformadas por microorganismos patógenos y se transforman en una fuente de contaminación constante.

Hasta el momento las contaminaciones cruzadas indirectas son un gran desafío en la industria, en restaurantes, comedores, establecimientos de producción artesanal e inclusive en los hogares, causando enfermedades y pérdidas económicas (ANMAT, 2003).

En resumen, según la bibliografía consultada, una de las razones más comunes de la contaminación del alimento/producto es la contaminación cruzada indirecta, causando serios problemas en la salud pública (Garret y col., 2008; OMS, 2000).

Biopelículas

La contaminación microbiana presente en las superficies puede ser fácilmente eliminada con una metodología de limpieza y desinfección convencional. Pero cuando determinadas bacterias encuentran un medio ambiente favorable, pueden desarrollar un mecanismo de adherencia y formar un ecosistema microbiano organizado (Rodríguez R., 2016). Estos

microorganismos adheridos a la superficie viva o inerte (hidrófobas o hidrófilas), con características funcionales y estructuras complejas son denominados biopelículas o *biofilms* (Carpentier y col., 1993; Costerton y col., 1999; Peña S, 2010).

En la industria alimentaria es muy común encontrar biopelículas en diferentes materiales, pudiendo estar constituidas por microorganismos del deterioro y patógenos, formando las denominadas biopelículas mixtas (Wang y col., 2012). Fuster i Valls N, (2006) comunicó brotes de ETA producidos por contaminación cruzada indirecta con superficies que estaban en contacto con alimentos. Los agentes involucrados fueron *Escherichia coli* O157:H7 (carne molida, superficie de una máquina de moler carne), *Listeria monocytogenes* (salchichas, máquina de llenado), *Salmonella* Agona (cereales de desayuno, equipos y línea de proceso) y *Salmonella* Enteritidis (helado, tanque de transporte y almacenado).

i. Definición

Antoine Van Leeuwenhoek conocido como el padre de la Microbiología, en 1683 describió que al observar por primera vez la superficie de sus dientes descubrió unas formas a las que nombró “*animicules*”. Este descubrimiento lo informó en la *Royal Society of London* (Jass y col., 2003).

“*The number of these animicules in the scurf of a man's teeth are so many that I believe they exceed the number of men in a kingdom*” [El

número de estas animículas en la escoria de los dientes de un hombre son tantas que creo que superan el número de hombres en un reino] (CBE, 2018).

Hasta fines de la década de 1970 lo más aceptado era la tendencia a pensar que los microorganismos se encontraban en un alto porcentaje en forma unicelular, planctónica o libre y en estado puro, tal como se conocen en el laboratorio.

Con el correr del tiempo, el avance de la tecnología aplicada a la microbiología, el desarrollo de estudios complejos y el crecimiento académico de los investigadores, originó la teoría de que los microorganismos se combinan en grandes conglomerados en donde diferentes individuos establecen relaciones y dependencias (Chmielewski y col., 2003).

En la actualidad está claro que la gran mayoría de los microorganismos que se encuentran en la naturaleza están adheridos a superficies donde crecen formando biopelículas (Marsh Rosselló y col., 2005). Estas formaciones constituyen el estado habitual de las bacterias en la mayoría de los ecosistemas naturales (Stoodley y col., 2002).

En un principio el estudio de las biopelículas estuvo ligado al ensuciamiento biológico o *biofouling* que causaba problemas en la industria. Se definía a las biopelículas como una comunidad de bacterias

adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido (Varin y col., 2013).

Se entiende como “biopelícula bacteriana” a una comunidad sétil inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas irreversiblemente a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular polimérica producida por ellas mismas y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes (Costerton y col., 1999; Donlan y col., 2002).

ii. Estructura

Al principio de la década de 1970 no se insinuaba que una biopelícula estuviera formada por una estructura tridimensional compleja. Los primeros hallazgos mencionaban que las biopelículas estaban formadas por simples masas de material polimérico que albergaban microorganismos sin ningún tipo de organización. De esta teoría surgió una gran discusión acerca de la nutrición y respiración bacteriana dentro de una masa no organizada. Las respuestas empezaron a aparecer con la aparición del microscopio confocal de barrido. Este demostró que los microorganismos sétiles crecían formando microcolonias dentro de una matriz polimérica que incluía canales abiertos por los que circulaban todos los requerimientos (Characklis y col., 1973; Costerton y col., 1987). Estas microcolonias podían estar compuestas por un 10-25% de células y un 75-90% de matriz polimérica (Garret y col., 2008; Marsh P., 2005).

El intercambio de nutrientes es facilitado por la arquitectura de la biopelícula y permite que estas comunidades desarrollen un espesor y una complejidad considerable, mientras que las células individuales que las componen se mantienen en óptimas condiciones nutricionales, aunque se encuentren en diferentes lugares de la biopelícula (Díaz C., 2011).

iii. Formación

Según la bibliografía consultada, al menos tres son los mecanismos que dan origen a la biopelícula. Uno de ellos es la división binaria de las células que se encuentran adheridas. El segundo es la redistribución de las células adheridas por medio de la movilidad superficial. El tercero es la agregación celular de células planctónicas en los fluidos donde se encuentra la biopelícula (Tolker-Nielsen y col., 2000; Dalton y col., 1996).

Las etapas de formación de las biopelículas es extensamente estudiado por la comunidad científica. Se pueden encontrar datos bibliográficos en los que se atribuyen 4 ó 5 etapas de formación. En este trabajo se eligió la descripción publicada por Díaz C. (2011) (figura 3).

Primera etapa: se produce la adsorción de una fina película orgánica sobre la matriz (película acondicionante) que cambia las características fisicoquímicas según el tipo de moléculas adsorbidas en la superficie (Schneider y col., 1994).

Segunda etapa: corresponde a la adhesión reversible de microorganismos a una matriz. En 1964 Mitchell y Marshall (Costerton J, 1999) examinaron los primeros estadios en la formación de biopelículas, diferenciando la adsorción reversible de la irreversible. En primera instancia la célula bacteriana interactúa con la matriz por medio de las fuerzas de Van der Waals y las fuerzas de interacción electrostáticas (base de la teoría de DLVO, Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) (Verwey E., 1948). Cuando se produce un acercamiento a la matriz estas interacciones son superadas por apéndices extracelulares (por ejemplo, pilis, fimbrias y flagelos) (Rodríguez R., 2006). En este estadio las células pueden abandonar la superficie y volver al estado planctónico. Poseen un comportamiento específico como el *twitching* (contracciones), *gliding* (deslizamiento) y la formación de agregados e hileras bacterianas. La adhesión reversible puede suceder de dos maneras, una activa y otra pasiva. En la primera, es de gran importancia la motilidad celular (flagelos, fimbrias y pilis tipo IV) que ayudaría vencer las fuerzas de repulsión. En bacterias inmóviles (ej. Estreptococos) el factor más importante son las proteínas de superficie que favorecen la adhesión. En la segunda, son los factores externos a las células (gravedad, difusión, dinámica de fluidos) los que intervendrían en forma directa en la primera etapa de la adhesión celular a las superficies.

Tercera etapa: se denomina adhesión irreversible, porque la célula produce un enlace permanente a la matriz, mediado por diferentes apéndices celulares y la producción de biopolímeros. Esta etapa está

identificada porque la célula se une por medio de cápsulas, fibrillas, fimbrias, pilis y *EPS* (*extracellular polymeric substances*) (Flemming y col., 2007). En este momento la adhesión no se encuentra tan afectada por factores extrínsecos (pH, electrolitos y temperatura). Cuando las bacterias son rodeadas por los *EPS* ya se consideran parte de la biopelícula. En este caso los *EPS* forman una especie de “jaula o contenedor” que encierra las bacterias. Este fenómeno fue denominado por Flemming (2007) “*House of Biofilm Cells*”. Los componentes del *EPS* microbiano son polímeros biosintéticos, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía según la temperatura. Las especies bacterianas que no producen exopolisacáridos tienen menor capacidad de adhesión y poder patógeno (Christensen y col., 1982). Uno de los eventos más importantes en la adhesión irreversible es la presencia del pili tipo IV, que puede extenderse y contraerse generando un movimiento por la superficie (*twitching*) responsable de la formación de microcolonias (O'Toole y col., 1998). La *Escherichia coli* O157:H7 produce un tipo de fibra denominada “*curly*” (rizadas) cuya composición son proteínas amiloides que colaboran en la adhesión de dicho microorganismo a las superficies y a producir la estructura tridimensional de la biopelícula (Ryu y col., 2004). Cada fibra *curly* está compuesta de una cadena de repetición de subunidades de proteínas idénticas llamada CsgA, que puede ser modificada mediante la adición de péptidos.

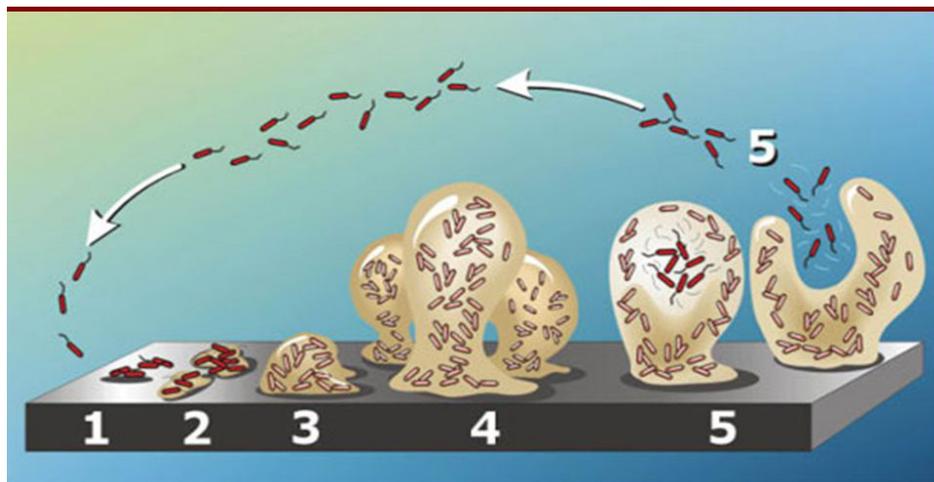
Cuarta etapa: se produce la maduración de la biopelícula, mediante el desarrollo de una estructura tridimensional muy compleja, con canales, poros y la redistribución de bacterias dentro de la matriz. El incremento de la complejidad se origina debido a que los organismos se replican, mueren y los componentes celulares interactúan con todo tipo de moléculas circundantes presentes en el medio. El crecimiento de la biopelícula es directamente proporcional a cantidad de nutrientes presentes en el medio y también a la eliminación de los residuos metabólicos. Otros factores como el pH interno, la penetración de oxígeno, las fuentes de carbono y la osmolaridad pueden controlar directa o indirectamente el crecimiento de la biopelícula.

Quinta etapa: liberación o desprendimiento de células. Se han planteado varias hipótesis para explicar este fenómeno entre las que se encuentran la falta de nutrientes, de oxígeno, cambios en el pH, etc. Estas hipótesis explicarían el desprendimiento de los cúmulos bacterianos en busca de otro nicho ecológico que satisfaga sus necesidades. Una de las características más sobresalientes en esta etapa es que las células que se han desprendido y alejado de su nicho, pueden ser capaces de revertir a su estado planctónico, transformando así a las biopelículas en un ciclo completo. Los tres principales mecanismos para generar el desprendimiento son erosión, separación y abrasión. En tejidos vivos, estos desprendimientos suelen ser de gravedad en pacientes con alguna biopelícula instalada ya sea en un catéter o en una cavidad del corazón. En cambio, en el medio ambiente donde se producen alimentos se

recomienda que al momento de aplicar la limpieza no se produzcan aerosoles ya que las gotas pueden transferir pequeños cúmulos o simplemente bacterias a otros lugares.

Las células que se adaptaron al estado planctónico pueden producir problemas en la salud pública por haber incorporado genes de resistencia a antimicrobianos y a desinfectantes (Yusibeska y col., 2011; Garçao Curiao T, 2014).

Figura 3: Etapas en el desarrollo de las biopelículas.



iv. Cinética Celular

En la primera fase las células que lograron la adhesión se sobreponen a una fase de adaptación. Superada esa instancia las células rápidamente comienzan con la división celular (división binaria) originando células hijas que recubren toda la superficie en torno a la primera adhesión (Hall-Stoodley y col., 2002). El período siguiente es la fase de crecimiento exponencial que está relacionado en primer lugar a la

cantidad de nutrientes y oxígeno presentes en el medio. Las células crecen generando una estructura similar a un hongo con canalículos internos, esenciales para la supervivencia de los microorganismos. En esta etapa se produce una liberación de polisacáridos de adhesión intercelular que, sumado a la presencia de cationes divalentes, producen una interacción muy fuerte entre las células (Garret y col., 2008; Navia y col., 2010). La fase estacionaria de crecimiento se caracteriza por la equivalencia en la velocidad de división celular y la velocidad de muerte. En esta etapa prevalece una alta concentración de mecanismos de señalización celular implicados en la inducción de procesos genéticos para la producción de materiales de la matriz celular (Garret y col. 2008). La fase de muerte celular se relaciona con el desprendimiento de la biopelícula. Se efectúa la liberación de enzimas de producción endógena que originan la ruptura de los polisacáridos de adherencia celular provocando la liberación de una porción de la biopelícula y la colonización de una nueva superficie (Navia y col., 2010).

v. Características de la matriz que influyen en formación de las biopelículas

Las características fisicoquímicas más importantes al momento de la adhesión son la energía superficial, rugosidad y la carga superficial.

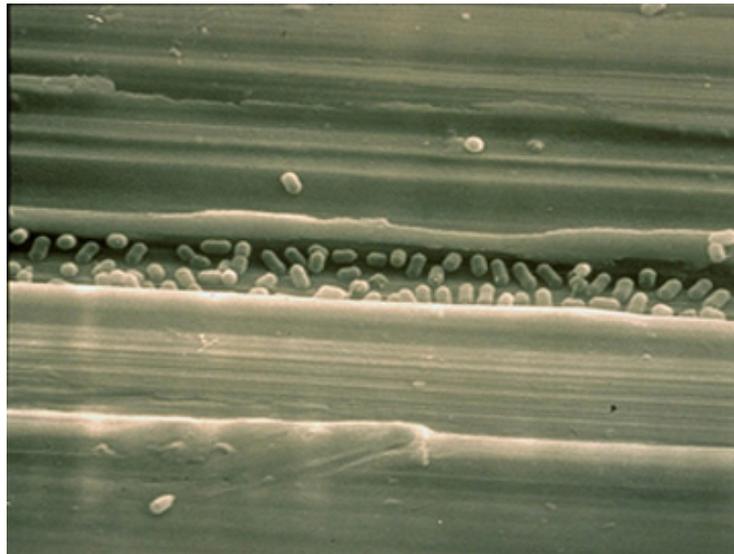
- Energía superficial. Hidrofobicidad: Cuando una superficie posee una alta energía superficial puede favorecer las condiciones de hidrofilia (acero inoxidable). Cuando la energía superficial es baja

favorece la hidrofobia (resinas). Cuando las bacterias poseen una mayor energía superficial a la del medio, la hidrofilia favorece su adhesión y en forma contraria la hidrofobia favorece a las bacterias que tienen una menor energía superficial. Es importante tener en cuenta que los sustratos que tapizan las superficies pueden lograr un efecto amortiguador y enmascarar los efectos del material (láminas de proteínas) en la etapa de adhesión. Hay que considerar que las bacterias pueden tener cierta selectividad con diferentes sustratos (Díaz C., 2011). Se podría concluir que el sustrato puede transferir propiedades fisicoquímicas y tener influencia en la etapa de adhesión.

- Rugosidad: es uno de los factores más importantes para que las bacterias se adhieran a una matriz. También hay diferentes explicaciones del porqué de las ventajas de la rugosidad. Una de ellas sugiere que las bacterias pueden tener un lugar donde no llegan los utensilios de limpieza y no se produce el “despegado”. Otra señala que las bacterias tienen la oportunidad de encontrar una mayor cantidad de puntos que benefician la adhesión y finalmente, otras señalan que los defectos en las superficies pueden retener el material orgánico necesario para la adhesión. También se considera que al aumentar la rugosidad aumenta el área de superficie que favorece la adhesión (Boulangé-Peterman, 1997; Stevens y col., 1993; Katsikogianni M., 2004; Abalos C., 2005; Whitehead y col., 2005; Fuster i Valls N., 2006; Díaz C.,

2011). Sin embargo, otros autores no encuentran una correlación lógica entre la rugosidad y la adhesión bacteriana a las superficies (Vanhaecke y col., 1990; Mafu y col., 1990; Diaz C., 2011) (foto 1).

Foto 1: *Listeria monocytogenes* en rugosidades del acero inoxidable (Katusic M. 2002)



- Carga superficial: Las bacterias a pH neutro poseen generalmente carga negativa pero suele estar influenciada por las condiciones de cultivo, etapa del cultivo, la fuerza iónica y el pH del medio (Walker S., 2005). Según Avalos (2005) con el acercamiento de la bacteria (carga negativa) a la superficie (mayormente con carga negativa) aparece una fuerza de repulsión. De la interacción entre estas fuerzas depende el mayor o menor acercamiento a la superficie. Se denomina energía de Gibbs. Las cargas iónicas de la bacteria y de la superficie están influenciadas por el medio iónico en que están sumergidas. Cuando son altos la doble capa es más delgada y permite un mayor acercamiento. En medios iónicos bajos la doble capa es de mayor grosor y por lo tanto la distancia entre la célula y

la superficie es mayor. En esta situación es lógico pensar que el acercamiento de la bacteria a la superficie influirá directamente en la predicción de la adhesión, ya que a 2 nm es factible que la adhesión sea irreversible y a 10 nm puede considerarse como reversible (Quirynen y col., 1990; Avalos C., 2005)

vi. Tipos de superficies empleadas en la industria alimentaria: Acero Inoxidable (AI), Polietileno de Alta Densidad Alto Peso Molecular (PEAD) y Politetrafluoroetileno (PTFE).

La elección de los materiales que están destinados al contacto con los alimentos es una de las tareas más importantes en la industria alimentaria. Dependiendo del estudio de las necesidades realizado “*in situ*” será el grado de satisfacción que se obtendrá de los materiales elegidos. Las características de la matriz juegan un rol preponderante en favorecer o no la adhesión bacteriana. A esto se deben sumar otras propiedades de los materiales tales como facilidad de limpieza, resistencia al desgaste y corrosión, resistencia a la presión, etc.

También es importante tener en cuenta que hay factores que no son propios de la matriz que pueden tomar un rol decisivo en la adhesión bacteriana. Se puede considerar que el diseño (lugares en donde no llega la sanitización), la mala praxis en la limpieza (uso de materiales que modifican la superficie), la efectividad de los detergentes y desinfectantes y la temperatura del agua que se usa en la limpieza, son factores que

decididamente influyen en la formación y proliferación de las biopelículas. La adhesión bacteriana está sujeta a la afinidad de cada bacteria a la superficie en cuestión. Algunas tienen más afinidad por las superficies hidrófilas (metales) y otras por superficies hidrófobas (caucho, plásticos). Meyer (2003) y Ríos Castillo (2014) publicaron sobre la facilidad para formar biopelículas en diferentes materiales. Los materiales que tienen facilidad mínima son vidrio, acero inoxidable, polipropileno, policloruro de vinilo (pvc), polietilenos, politetrafluoroetileno (PTFE) y etileno propileno dieno y la máxima facilidad, el látex.

Otro fenómeno que juega un papel determinante es la afinidad que puedan tener ciertos materiales por moléculas orgánicas (primera etapa en la formación de las biopelículas). McGuire (1989) informó que el acero inoxidable y el PTFE pueden mostrar afinidad sobre ciertas sustancias orgánicas de la leche y dar paso a la formación del sustrato acondicionante y la posterior formación de las biopelículas (Ríos Castillo H, 2014). Está demostrada la formación biopelículas en vidrio, acero inoxidable, nylon, caucho, látex, PTFE, polietilenos, etc. Todos estos son materiales que forman parte de la estructura de una planta de producción de alimentos (Myszka y col., 2011).

vii. Comunicación entre células. *Quorum Sensing*

A fines de la década de 1970, Nealson (1977) se encontraba dedicado al estudio de la bioluminiscencia producida por *Vibrios* marinos. Fue cuando explicó el mecanismo de autoinducción. Casi 20 años

después, se utilizó por primera vez en Inglaterra el término *Quorum sensing* (QS) en una revisión publicada por Fuqua (1994). Este autor describió el fenómeno que utilizan las bacterias para conocer su concentración en un ambiente determinado y decidir el momento que van a poner en marcha la expresión de un determinado conjunto de genes para desarrollar una respuesta concreta y en forma simultánea. El resultado de estas interconexiones hizo que surgieran propiedades difíciles de explicar a partir de una sola célula bacteriana. Indudablemente existía algún modo por el que la bacteria generaba algo similar a una señal que estaba destinada a otras bacterias. Esto fue definido como la “comunicación” entre células que es un fenómeno indispensable en la formación de las biopelículas (Lazdunski y col., 2004; McLean y col., 2004; March Rosselló y col., 2013).

La presencia del QS ha sido demostrada en bacterias Gram negativas y Gram positivas y está representada por señales inter e intracelulares que generan beneficios para grupos de microorganismos. Esto está basado en la difusión y posterior detección de moléculas que actúan como una señal denominadas “autoinductores”. Las bacterias Gram negativas difunden al espacio intercelular compuestos de bajo peso molecular denominados Acil Homoserina Lactonas (AHLs) (figura 4a). Estas moléculas poseen diferentes longitudes (según la cantidad de carbonos) y son capaces de controlar genes específicos relacionados a la cantidad de bacterias que componen la biopelícula. Al difundir por las membranas al medio externo aumentan la concentración con el

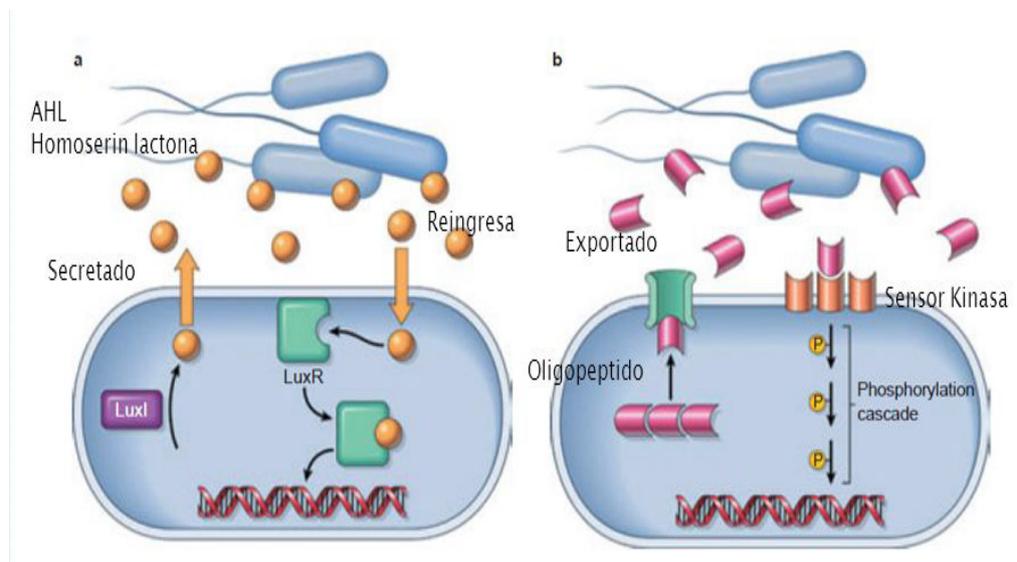
crecimiento de la biopelícula (Barreto A., 2011). Las *Myxobacterias* y *Streptomyces* fueron los primeros microorganismos en que se observó la presencia de QS, sin embargo los estudios en el *Vibrio fischeri* son el ejemplo más conocido (Singh y col., 2002; Thomas y col., 2006). Los sistemas QS identificados en el *V. fischeri* son el *luxI* y *luxR* y han sido encontrados en casi todas las bacterias Gram negativas. Estos sistemas han sido extensamente estudiados en *Pseudomonas* spp. y *Escherichia coli* y se les ha otorgado una gran importancia en la maduración de las biopelículas y la expresión de los genes de virulencia.

En las bacterias Gram positivas los péptidos autoinductores producidos por *Staphylococcus aureus* (habitante frecuente en la piel en humanos y en ocasiones un patógeno oportunista) actúan como señal para otras células (Flores Encarnación y Col., 2011).

Estas bacterias usan como señales un sistema de dos componentes, un sensor unido a membrana como receptor llamado histidín quinasa que actúa como puerto para los péptidos autoinductores. El sistema accesorio de regulación de genes (Agr) es uno de los más importantes y ha sido caracterizado como un operón en *S. aureus*. Posee gran relevancia en el control y regulación de la expresión de genes de virulencia. Este operón depende de la densidad celular, a través de la producción y detección de los péptidos autoinductores (Waters C., 2005; Shank y col., 2009; Williams y col., 2007) (figura 4b).

El QS es un mecanismo por el que las bacterias regulan o sincronizan cambios en su expresión genética en función de su densidad poblacional, como por ejemplo la producción de antibióticos, toxinas, pigmentos, exopolisacáridos (formación de biopelículas), motilidad y otros factores de virulencia. Las células mutantes que carecen de estas señales producen biopelículas con una arquitectura débil que puede ser removida de las superficies muy fácilmente (Díaz D., 2010).

Figura 4: *Quorum sensing* en bacterias Gram negativas (a) y Gram positivas (b) (Raffa R., 2005)



viii. Otras propiedades que influyen en la formación y desarrollo de las biopelículas. Movimientos bacterianos.

Las bacterias en su vida natural se enfrentan constantemente a medios que les son adversos, por lo que desarrollaron estrategias para su supervivencia. En este caso, y refiriéndonos a la formación y desarrollo de

las biopelículas, las bacterias utilizan de manera independiente o grupal, movimientos para favorecer esta formación. Algunos de los movimientos más comunes son: *swimming*, *swarming*, *gliding*, *twitching* y *sliding*. El *swimming*: la bacteria flagelada se vale del movimiento rotatorio de sus flagelos para desplazarse por el líquido. El *swarming* es cuando las bacterias dependen de la presencia de flagelos, y se observa comúnmente como crecimiento por oleadas. Para que esto ocurra, toda la colonia debe colaborar como un enorme enjambre perfectamente coordinado. Estos grupos bacterianos se desplazan conectados entre sí y a esta modalidad se la conoce como *raft*. El *gliding* es cuando la bacteria se desliza por medio de proteínas que se adhieren a la superficie. Es considerado un movimiento pasivo que no consume energía. Se favorece en medios húmedos o con fina capa acuosa, es cooperativo y no requiere la presencia de pilis o flagelos. El *twitching* es cuando la bacteria puede retorcerse en forma errática y está representado por los microorganismos que poseen los pilis tipo IV y es individual. El *sliding* es una forma pasiva de movilidad y requiere la presencia de agentes químicos que reduzcan la tensión superficial, más la ayuda de la presión ejercida por la duplicación celular, pueden lograr este movimiento (Harshey R., 2003). El *swarming* es uno de los movimientos más importantes porque se lo relaciona directamente con la formación de las biopelículas (Kaiser y col., 2007) (figura 4).

Figura 5: Swarming en medio de cultivo sólido.



ix. Intercambio genético

Las bacterias sésiles poseen una expresión genética diferente a las bacterias planctónicas debido a que hay genes que se expresan solamente en bacterias que forman o han formado parte de las biopelículas. Dentro de las biomasas se puede encontrar una gran cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN), plásmidos (ADN extra cromosómico), enzimas, etc. Por lo que es muy lógico considerar que la transferencia génica mediada por plásmidos es muy activa en las biopelículas. Además de los plásmidos, otras estructuras genéticas denominadas móviles comunes en microorganismos gram negativos (transposones y el sistema integrón/cassettes de genes) desempeñan roles muy importantes en el “reclutamiento y la dispersión” de los determinantes de resistencia, incluso entre bacterias poco relacionadas filogenéticamente (Di Conza J., 2013).

Por lo tanto, si las estructuras génicas móviles están presentes en la matriz de las células dadoras, pueden ser transferidas a las células que tengan características receptoras. La recepción de estas estructuras

podrá modificar el comportamiento de estas células ante los antibióticos o sanitizantes (Ghigo J., 2001; Lou y col., 2005).

x. Métodos de estudio utilizados

En la actualidad existe una gran cantidad de métodos para el estudio de las biopelículas. El continuo trabajo de especialistas ha generado distintas herramientas por las que se pueden estudiar las biopelículas en sus diferentes etapas. Azeredo y col. (2017) concluye en su trabajo que en la actualidad uno de los inconvenientes que no ha sido solucionado es cómo llegar a lograr un método de disección que permita aislar los componentes de la matriz u obtener una célula en forma individual.

Las diferentes aristas que presenta el estudio de las biopelículas dan lugar a que el investigador pueda elegir el o los métodos según hacia donde esté dirigido el objetivo de su estudio.

A continuación se detallan algunos de los métodos de estudio de las biopelículas.

- **Método Microbiológico:**

Recuento de unidades formadoras de colonia en agar sólido. Sigue siendo una de las técnicas más usadas para determinar la cantidad de células viables de la biomasa. Es una técnica accesible y se encuentra disponible en los laboratorios. Posee algunas deficiencias como la cantidad de células extraídas del medio y que

las biopelículas poseen células vivas pero no cultivables. Para obtener un resultado más preciso se hace extremadamente necesario estandarizar una metodología (Ahimou y col., 2007; Faleiro Naves P., 2010; Cerca y col., 2011; Li y col., 2014; Boid y col., 2014; Azeredo y col., 2017).

- Métodos moleculares:
 - Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*Polymerase chain reaction q-PCR*) (Klein y col., 2012).
 - Reacción en cadena de la polimerasa con tratamiento de Propidium Monoazide (*Polymerase chain reaction PMA-qPCR*) (Alvarez y col., 2013).
- Métodos físicos:
 - Obtención en forma indirecta del peso de la biomasa húmeda o seca (Trulear y col., 1982).
 - Espectroscopía de impedancia electroquímica (Dominguez-Benetton y col., 2012).
 - Reflectometría ultrasónica (Sim y col., 2013).
- Métodos químicos :
 - Microtitulación en placa con colorante para biomasa total (Christensen y col., 1985; Fletcher M., 1977).
 - Microtitulación en placa con colorante para actividad metabólica (Koban y col., 2012).
 - Análisis fosfolipídico de la biomasa (Pinkart y col., 2002).
- Otros:

- Microscopio confocal láser de barrido (Lawrence y col., 1991; Neu y col., 2014b).
- Microscopia de fluorescencia (Azevedo y col., 2003).
- Microscopia electrónica de barrido (Kotra y col., 2000).
- Microscopia atómica (Dufrene Y. 2002).

Las biopelículas y su repercusión en la Industria Alimentaria

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biopelículas en superficies orgánicas (carne, alimentos en general) e inorgánicas (superficies de equipos, utensilios, etc). Esto es posible debido a las estrategias que los microorganismos poseen para poder adherirse, desarrollar, madurar y desprender bacterias o cúmulos bacterianos desde diferentes matrices como, plástico, cristal, madera, metal, materia prima y alimentos. Si no son controlados estos sucesos pueden contaminar los alimentos e influir en forma directa tanto en su vida útil como en la transmisión de ETA (Gunduz y col., 2006).

Para lograr el control de las biopelículas en los ambientes destinados a la producción de alimentos, es absolutamente necesario desarrollar “*in situ*” o “*cleaning in place*” (*CiP*) un sistema de limpieza y desinfección (LD) que sea efectivo, repetible y auditable (Shi y col. 2009).

i. Limpieza - Desinfección (LD)

En primera instancia se definen los conceptos de limpieza y desinfección y se explican las diferencias que existen entre uno y otro. Esta frase es la que motiva el comienzo de todas las capacitaciones en manipulación de alimentos a operarios del ramo. En los diferentes establecimientos no todos los operarios saben concienzudamente qué significa cada una de estas palabras (experiencia personal). Es habitual observar la preparación de soluciones de limpieza mezclando detergente con hipoclorito de sodio. A continuación se detallan las definiciones de limpieza y desinfección.

Limpieza: son todas las operaciones utilizadas para eliminar la suciedad visible o microscópica. Según la FAO: *“Limpieza es la eliminación de tierra, residuos de alimentos, suciedad, grasa u otras materias no aceptables”*.

Los productos que se utilizan son los detergentes que se eligen según la naturaleza de la suciedad que se pretende limpiar. Estos agentes limpiadores tienen la capacidad de mojar y penetrar la suciedad con el fin de removerla.

Desinfección: es un proceso físico o químico que elimina o inactiva agentes patógenos como bacterias, virus y protozoos (RESOLUCIÓN MERCOSUR GMC 80/96, 2006). Según la FAO: *“Desinfección es la reducción del número de microorganismos presentes en el medio*

ambiente por medio de agentes químicos y/o métodos físicos, a un nivel que no comprometa la inocuidad o la aptitud del alimento”.

Limpieza y desinfección juntas pueden ser tomadas como sinónimo de higienización o sanitización, y tienen como finalidad reducir la población microbiana a niveles que no generen riesgos a la salud humana (Fuster i Valls N, 2006).

La LD es una de las operaciones de mayor impacto y requiere el máximo de compromiso y responsabilidad de parte de las autoridades de las empresas. Es uno de los requisitos previos infaltables para la implementación del *HACCP* y se encuentra desarrollada en el capítulo de POES. Los planes de LD deben ser desarrollados según los requerimientos propios del lugar, ya que no siempre una misma metodología de LD es exitosa. El estudio de todos los pasos de procesos de fabricación “*in situ*” es una de las estrategias más importantes a la hora de montar un sistema donde el objetivo primario es lograr alimentos inocuos (SENASA, 2016; Pennimpe y col., 2003).

Para lograr una LD exitosa se deberá investigar el tipo de suciedad que se tiene que limpiar en las diferentes etapas del proceso. Puede haber suciedad de origen biológico (sangre, grasa, carne, etc.), químico (aceites y grasa de motores, plaguicidas, combustibles, etc.) y físico (partículas de metal, alambres, astillas de madera, etc.) y según la que esté presente será el tipo de estrategia que se tendrá que desarrollar (OPS, 2015).

Los parámetros que se deben tener en cuenta para efectuar una limpieza son:

- Origen de la suciedad (física, química o biológica).
- Objeto a limpiar (forma, material y rugosidad).
- Etapas (limpieza en seco, pre enjuague, detergente, enjuague, desinfectante, enjuague y secado).
- Productos (tipo, modo de empleo, temperatura, tiempo de contacto y dosificación).
- Periodicidad (según los resultados de la verificación).

Tipos de Limpieza:

- Método físico

Es la operación que involucra el retiro de la suciedad por medio de arrastre utilizando papel, tela, agua a presión, vapor, aire, arena, cepillado, barrido, restregado o aspirado. Se debe hacer en forma controlada para no generar aerosoles y evitar contaminar otros lugares.

- Método químico

Los detergentes son sustancias químicas que tienen la capacidad de separar o deshacer la suciedad que está en una superficie. La estructura se compone de una parte lipofílica y otro hidrofílica que otorgan las características necesarias para remover la suciedad y son denominadas "tensoactivas o

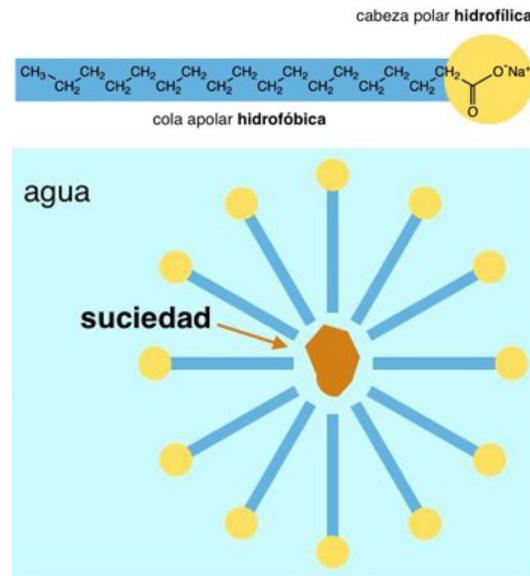
tensioactivas”. La parte apolar de la sustancia tensoactiva se fija a la suciedad quedando la parte polar en contacto con el agua. De esa manera gran cantidad de moléculas de detergente se fijan sobre la suciedad, la separan de la superficie y forman una emulsión.

El mercado ofrece una gran diversidad de detergentes y la decisión de qué tipo o qué marca usar estará sujeta al tipo de operación que se vaya a realizar (Rosen y col., 2012; OMS, 2016; Sonja Koukel C., 2012).

Modo de acción de los desengrasantes:

- Humectación: Reduce la tensión superficial del agua y es capaz a la vez de disminuir la tensión interfasial entre agua y otra superficie, por adhesión o agregado a la interfase sólido-líquido o líquido-líquido.
- Penetración: Es la capacidad de penetrar o introducirse en las superficies porosas sucias o en la suciedad.
- Emulsión: La parte hidrofóbica se adhiere a la suciedad, rodeándola y separándola de la superficie (figura 6). Se forma la emulsión que es la dispersión o suspensión de finas partículas de uno o más líquidos en otro líquido. Por ejemplo, el aceite o grasa en agua.
- Suspensión: Consiste en dejar la suciedad o partículas de suciedad en solución, evitando que estas se vuelvan a depositar en la superficie.

Figura 6: Mecanismo de acción de los detergentes.



Clasificación de detergentes según el pH

- Detergentes alcalinos: Tienen un valor de pH entre 8 y 10 (combinación de tensioactivos y álcalis). Son muy efectivos cuando las suciedades son grasas, aceites, proteínas y otras suciedades orgánicas.
- Detergentes ácidos: Tienen un pH entre 0 y 6. Es la combinación de agentes tensioactivos con ácidos. Recomendados para efectuar limpieza de suciedad inorgánica.
- Detergentes neutros: Tienen un pH cercano al 7. Están compuestos por tensioactivos. Son efectivos en la eliminación de aceites ligeros, partículas, cloruros y otras sales.

Clasificación según su carga eléctrica

- Detergentes no iónicos: Tienen carga neutra y generan una mayor cantidad de espuma. Son utilizados en preparaciones farmacéuticas y en la industria cosmética y como emulsificantes y solubilizantes en los alimentos.
- Detergentes catiónicos: Tienen carga positiva en solución acuosa y no “lavan” muy bien. Contienen altas concentraciones de desinfectantes.
- Detergentes aniónicos: Poseen carga negativa en solución acuosa. Son muy utilizados en la industria alimenticia y en los hogares.

ii. Desinfección

La industria alimentaria dispone de gran cantidad de desinfectantes en el mercado. Deben estar aprobados por el Ministerio de Salud de la Nación (Argentina) y el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y deben utilizarse según las instrucciones del fabricante (ANMAT, 2017).

El Centro de Control de Enfermedades (*Center of Diseases Control, CDC*) estableció una clasificación de desinfectantes según su actividad ante diferentes microorganismos (Alonso y col. 2004).

- Desinfección de alto nivel. Se eliminan gran cantidad de esporas, incluyendo los virus lipofílicos, hidrofílicos y *Mycobacterium tuberculosis*.
- Desinfección de bajo nivel. Se eliminan la mayoría de las bacterias, algunos virus y algunos hongos, pero no necesariamente microorganismos resistentes como el bacilo de la tuberculosis o esporas bacterianas.
- Desinfección de nivel intermedio. Proceso por medio del cual se eliminan formas vegetativas de bacterias, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, hongos y virus, pero no necesariamente las esporas bacterianas

Principales mecanismos de acción: producen daño en la pared celular, alteración de la permeabilidad de membrana, alteración de los coloides del citoplasma, inhibición enzimática, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, etc. (Rutala y col., 2008).

Desinfectantes habitualmente usados en la industria alimentaria: alcoholes, cloro y componentes clorados, formaldehidos, glutaraldehidos, peróxido de hidrogeno, ácido peracético, idodósforos, amonios cuaternarios y ácidos orgánicos (acético, láctico, cítrico, etc.) (Khars R., 1995).

Aspectos básicos que deben tenerse en cuenta en la elección de un desinfectante:

- Los principios y prácticas del control de microorganismos.

- Tipos de microorganismos que se deben eliminar.
- Tipo de material que se va a desinfectar.
- Protección de los operarios, equipos, producto y medio ambiente.
- Personal entrenado.
- No producir deterioro de los equipos.

iii. Plan de acción para la implementación de la LD

El establecimiento debe desarrollar un plan estratégico cuyos procedimientos (limpieza, desinfección, etc.) estén aprobados por los responsables de la empresa o institución y los entes fiscalizadores estatales.

Deben cumplir sin excepción la consigna de ser eficaz, repetible y auditable. Estas directivas para ser cumplidas necesitan personal altamente entrenado en todos los requisitos de seguridad laboral. El plan debe describir claramente los objetivos a cumplir, teniendo en cuenta la seguridad de todas las personas que estarán involucradas. Para obtener buenos resultados se deberá realizar un estudio *"in situ"* con el fin de obtener una estrategia de LD segura y eficiente para alcanzar los objetivos propuestos por los manuales de BPM (Sattar S., 2014; FAO 1997; FAO 2018).

Para el diseño del Programa de LD se debe recolectar la siguiente información:

- Qué superficies, instalaciones, equipos y utensilios deben ser limpiados y desinfectados.
- Cuándo deben realizarse las operaciones de limpieza y desinfección.
- Cómo y con qué métodos se realizarán estas operaciones.
- Cómo se comprobará el buen funcionamiento y eficacia de las actividades del plan.
- Quién o quiénes serán las personas encargadas de realizarlo.
- Cómo se verificará y se mantendrá en el tiempo el plan de LD.

Ejemplo de un diagrama de flujo de una LD.

1. Identificación de superficies que se deben limpiar y desinfectar. (Memoria descriptiva de la planta o establecimiento).
2. Elección del protocolo de sanitización: a) Limpieza, b) Desinfección. (Redacción de la operación en manuales. Elección de químicos a utilizar. Instructivos.)
3. Verificación: a) Inspección visual, olor y táctil b) Hisopados: análisis microbiológicos (Determinaciones microbiológicas, físicas o químicas en manuales, límites críticos, identificación de desvíos).
4. Cumple con los parámetros fijados. Registros.
5. No cumple con los parámetros fijados. Hay un desvío. Registra la "no conformidad". Aplicación de acciones correctivas. Verificación. Registros.

iv. El hipoclorito de sodio, el agua electroactivada y el ácido cético como agentes desinfectantes.

El Hipoclorito de sodio es un compuesto oxidante de acción rápida utilizado a gran escala para la desinfección de superficies, utensilios, ropa, desechos, desinfección del agua, eliminación de olores, etc. Cuando el hipoclorito de sodio se diluye en agua se genera ácido hipocloroso. Es un oxácido de cloro, posee electrones de valencia (I), es un ácido débil y un excelente desinfectante. Este ácido a su vez, se divide en ácido clorhídrico (HCL) y oxígeno (oxidante fuerte).

Existen varios mecanismos por los que el cloro puede destruir los microorganismos. Algunos de ellos pueden ser la inactivación enzimática y aminoácidos, no permitir la captación de nutrientes, inhibición de la síntesis proteica, oxidación de componentes de la cadena respiratoria, destrucción del ADN, etc. Actualmente se considera que es la suma de todos estos factores (CDC, 2008).

El hipoclorito de sodio es conocido en Argentina con el nombre de Lavandina® y contiene entre el 3,6 y 6,5% de cloro libre. Posee un pH cercano a 11, es muy irritante y corrosivo. Es muy inestable y se recomienda realizar las diluciones sólo antes de su utilización y no almacenarlas. Las propiedades más importantes incluyen su actividad antimicrobiana, fácil uso y bajo costo. El hipoclorito es efectivo contra bacterias vegetativas y decrece su efectividad contra esporos bacterianos, hongos y protozoarios. La dilución recomendada para desinfección de

superficies es de 0,5% y en derrames biológicos el 1% (Rutala y col. 1997; ANMAT, 2017). La preparación de una solución de hipoclorito se muestra en la figura 7.

Figura 7: Preparación de soluciones de hipoclorito de sodio (Seguridad biológica, 2016).

<ul style="list-style-type: none"> • FÓRMULA: $V1 = (V2 * C2) / C1$ • DONDE: V1: Es el volumen que requerimos de la solución concentrada de cloro y que necesitamos calcular para preparar la solución. V2: Es el volumen de la solución final de cloro que queremos preparar. C1: Es la concentración de cloro que contiene la solución original. Este valor deberán revisarlo en la etiqueta de la botella o frasco de cloro, y es variable dependiendo de la marca. C2: Es la concentración de la solución final de cloro que queremos preparar ml: mililitro 	<p>EJEMPLO: Preparar 1 litro (1000 ml) de solución de hipoclorito de sodio al 0.5% a partir de una botella que contiene 6.15% de cloro.</p> $V1 = (V2 * C2) / C1$ $V1 = \frac{(1000 \text{ mililitro} * 0.5\%)}{6.15\%}$ <p>V1 = 81 ml de hipoclorito de sodio 6.15%</p> <p>Restar 1000 ml – 81 ml = 919 ml de agua</p> <p>Entonces hay que medir:</p> $81 \text{ ml de hipoclorito de sodio } 6.15\% + 919 \text{ ml de agua destilada o desionizada}$ <p>1000 ml volumen final de la solución 0.5%</p>
---	---

El Agua electroactivada también es conocida como agua electrolizada (Taberero de Paz y col., 2013) o Amuchina® (AMUCHINA® solución, 2018). Es obtenida por la hidrólisis diafragmática de una solución de agua corriente saturada con cloruro de sodio al 26%. En la cámara hay dos electrodos, uno positivo (ánodo) y otro negativo (cátodo) que están separados por una membrana diafragmática donde se aplica corriente eléctrica. En el ánodo se produce el *anolyte* (anolito) que contiene ácido hipocloroso y microcarga eléctrica molecular (Duran H, 2010). El anolito posee pH neutro, potencial redox de +850 a +1000 mV, con alto poder desinfectante. Mazzitelli J. (2013) considera que su poder

desinfectante es superior al hipoclorito de sodio, no produce corrosión en equipos e instalaciones, no produce irritación de piel ni ojos, no ocasiona daños a humanos, animales, plantas ni al medio ambiente.

En el cátodo se produce el *catolyte* (catolito), una solución con poder detergente, sin espuma y de un pH de 11,5 a 12 que actúa como desengrasante (Mazzitelli J., 2013). La utilización del agua electroactivada como desinfectante en la industria agroalimentaria, ha sido informada por varios autores. Huang (2008) informó que ha sido utilizada en lavado de equipamiento, superficies inorgánicas, vegetales, carne de pollo, productos de mar entre otros.

El ácido acético es un ácido orgánico denominado por la *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* como ácido etanóico ($\text{CH}_3\text{-COOH}$). Es soluble en agua y esto favorece su uso como desinfectante de superficies orgánicas e inorgánicas (Químicas.net, 2018). No es tóxico y se encuentra dentro de la lista de *Select Committee on GRAS Substances (SCOGS)* desde el año 1977 (FDA, 2018). El ácido acético es comúnmente usado en la industria alimentaria para la desinfección de superficies en una solución al 2% (SAG, 2018; Benassatti y col., 1994; González-Fandos y col., 2014). El efecto antimicrobiano del ácido acético se produce de dos maneras. Una es la acidificación del medio extracelular. La otra, y más importante, es la acidificación interna del citosol debido a la penetración de la forma no disociada del ácido.

Cuando el ácido se encuentra en el citosol se produce la liberación de iones H⁺ (disociación), produce un aumento de la acidez que termina por inhibir las funciones metabólicas básicas de la célula. Esta condición es muy desfavorable para los microorganismos ya que puede llegar a comprometer la regulación de su medio interno y la renovación de sus componentes celulares. Indudablemente esta situación conlleva a la muerte celular (Copes J, 2005).

v. Control en superficies de contacto con los alimentos. Marco legal.

El SENASA emitió la circular 4176 inciso 1: Documento de Orientación sobre la Aplicación de Determinadas Disposiciones del Reglamento (CE) 2073/2005 Relativo a los Criterios Microbiológicos Aplicables en Productos (Reglamento CE 2073/2005, 2015). Punto ii: *Criterio de higiene de los procesos. Refiere a los Criterios de Higiene en los procesos (CHP) que se aplican para determinar el nivel de contaminación de enterobacterias y aerobios totales que presentan las materias primas (carcasas), especialmente al finalizar los procesos de transformación primaria y que indican que el grado de cumplimiento operativo de las BPM del proceso de producción es aceptable. Los CHP son valores indicativos de contaminación por encima de los cuales deben aplicarse medidas correctivas para mantener el control de la higiene del proceso. Los CHP se utilizan principalmente para validar y vigilar a lo largo del tiempo la eficacia de las prácticas correctas de higiene que se*

aplican en los frigoríficos. Para establecer un buen plan de validación o de vigilancia se tiene que elaborar un plan de muestreo adecuado con respecto al número de muestras, a la frecuencia, al período y a los lugares de toma de muestras, y a la interpretación y análisis de tendencias de los resultados. Estos Criterios no solo pueden ser aplicados a la carne sino también al personal (manos, guantes), al ambiente o a las superficies en contacto con la misma. La fase de aplicación es antes de la comercialización del producto, en el final del proceso de fabricación pero en el caso de las canales bovinas, ovinas, caprinas y equinas, después de su faenado pero antes de la aplicación de tratamiento superficial con ácidos orgánicos y del proceso de enfriado y para las aves de corral después de su enfriamiento. Todos los controles mencionados los deberá realizar el Servicio Inspección Veterinaria (SIV) que se encuentra en la planta procesadora, con la finalidad de verificar el cumplimiento por parte del Operador de Empresa Alimentaria (OEP) de la aplicación del Reglamento (CE) 2073/2005. ALIMENTICIOS.

Control microbiológico en zonas de trabajo y equipos:

Recuento de Mesófilos Aerobios y Familia Enterobacteriaceae

Propósito y alcance: Esta guía intenta proporcionar una herramienta de estrategia global, de utilidad para los Servicios de Inspección así como también a los Supervisiones encargados de los controles oficiales de plantas autorizadas a exportar con destino Unión Europea (UE). La mayoría de los muestreos y pruebas para demostrar el

cumplimiento con el Reglamento (CE) N° 2073/2005 se llevará a cabo por parte de los operadores de empresas alimentarias, no obstante el servicio de inspección veterinaria es responsable de auditar el cumplimiento de esta legislación.

Según lo expuesto anteriormente, todo operador de empresa alimentaria que exporte hacia Comunidad Europea deberá cumplir con la Directiva L 165/48 (Comunidad Económica Europea, 2001). Los valores medios del número de colonias en los análisis de superficies serán: Recuento total de colonias aerobias 0-10/cm² (valor aceptable) >10/cm² (valor inaceptable) y Enterobacterias 0-1/cm² (valor aceptable) >1/cm² (valor inaceptable).

Historicamente la higiene de las superficies que están en contacto con alimentos ha representado un gran problema en los establecimientos que producen alimentos. Los estudios realizados por Linton A. (1983) en *“Guidelines prevención and control of Salmonellosis part I and II”* indicaban que una superficie que contenga 3 UFC/cm², era considerada como muy buena (condición higiénica); 3-9 UFC/cm², buena; 10-29 UFC/cm², moderada; 30-90 UFC/cm²; mala. Estas sugerencias (al presente) son tenidas en cuenta por el Instituto de Salud Pública del Gobierno de Chile en el “Procedimiento recuento de microorganismos en suspensión por método de torunda en superficie” con fecha de revisión del 2008.

Considerando una mayor superficie de muestreo, Solberg y col. (1990) sugirió los siguientes valores microbiológicos para las superficies limpias y en uso: aceptable <5 UFC/6,8 cm² para superficie limpia y no aceptable (para superficies sucias) >20 UFC/6,8 cm². Nivel de tolerancia: 5-10 UFC/6,8 cm² para superficie limpia y 20-40 UFC/6,8 cm² para superficie sucia. Riesgo potencial: >10 UFC/6,8 cm² para superficie limpia y >40 UFC/6,8 cm² para superficie sucia.

El Código Alimentario Argentino (CAA) también establece dos categorías principales en cuanto a los criterios a seguir para la elaboración de patrones microbiológicos en la producción de alimentos.

- a. Criterio obligatorio. Se utiliza para referirse a los microorganismos considerados patógenos y/o sus marcadores, considerados de importancia en salud pública y de acuerdo con la clase de alimento.
- b. Criterio complementario (recomendatorio): a diferencia del anterior es el criterio relativo usado para la evaluación del proceso tecnológico utilizado para la obtención de un producto (ANMAT, 2018).

Al igual que la circular 4176 (2015), el CAA explica que las acciones correctivas se deben tomar cuando se ha superado el límite microbiológico establecido en el criterio designado. En la industria los establecimientos pautan los límites microbiológicos según su criterio de

control que habitualmente están por debajo de los límites microbiológicos dispuestos por los entes fiscalizadores.

Para los límites microbiológicos en superficies, el estudio y la mejora continua son los pilares necesarios para lograr la adecuación de medidas higiénicas que puedan cumplir con los requisitos solicitados.

Según la normativa, el complementario (recomendatorio) sería el de 0 a 10 UFC/cm² para los RAM (Recuento de Aerobios Mesófilos) y de 0 a 1 UFC/cm² para enterobacterias. El criterio obligatorio, la ausencia de microorganismos patógenos (ANMAT, 2018; CEE, 2001; Circular 4176, 2015).

vi. La importancia del estudio de biopelículas en superficies en contacto con alimentos y del desarrollo de protocolos de higiene en el Comedor Universitario de la Universidad Nacional de La Plata.

Debido a la relevancia que adquieren las biopelículas en distintos eslabones de la cadena alimentaria, el desarrollo de estrategias de control efectivas es la clave para obtener un alimento inocuo para toda la comunidad de la UNLP. Para lograr este objetivo se consideró de gran importancia realizar estudios microbiológicos "*in situ*", reproducir las biopelículas en las superficies usadas a diario y realizar desafíos con distintos protocolos de limpieza y desinfección utilizando detergentes neutros, alcalino y el Catolito (producto de la electrólisis parcial de una

solución concentrada de cloruro de sodio) y desinfectantes (hipoclorito de sodio, ácido acético y el Anolito o agua electroactivada).

El Comedor Universitario de la UNLP produce diariamente 9000 almuerzos y 3000 cenas para estudiantes de grado, de nivel secundario (Colegio Nacional, Liceo Víctor Mercante y Bellas Artes), primario (Escuela Anexa) y trabajadores docentes y nodocentes. El Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias asesora y capacita a todo el grupo de operarios desde la reapertura del Comedor en el año 2005.

Por esta razón, y con el único objetivo de resguardar la salud del variado grupo de consumidores, se planteó como meta el desarrollo de una estrategia general de inocuidad para obtener productos seguros para para la comunidad universitaria.

Contenido

Objetivo general

Determinar el tiempo de formación de biopelículas bacterianas a diferentes temperaturas y en superficies que están en contacto directo con el alimento, y su comportamiento ante la aplicación de diferentes estrategias de limpieza y desinfección.

Objetivos específicos

- Detección de biopelículas bacterianas sobre distintas superficies de contacto (bandejas, contenedores de plástico y tablas de corte) mediante la aplicación de solución colorante de cristal violeta.
- Realizar recuentos de aerobios mesófilos sobre las superficies que posean biopelícula.
- Aislar bacterias patógenas e indicadores (*Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp, *Listeria* spp, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) que se hayan desarrollado sobre las superficies de contacto para ser utilizadas en el bioensayo.
- Implementar un bioensayo a tres temperaturas y en superficies diferentes para evaluar la velocidad de formación de biopelículas de las distintas especies bacterianas involucradas.
- Aplicar diferentes protocolos de sanitización sobre las 3 superficies con biopelículas desarrolladas en 3 temperaturas “*in vitro*”.

- Aplicar y verificar "*in situ*" (Comedor Universitario) el protocolo de sanitización más efectivo obtenido "*in vitro*" sobre las superficies estudiadas.

Etapas

El trabajo de tesis se desarrollará en 3 etapas

Etapas 1

Objetivo General

Detección de biopelículas en superficies de bandejas, contenedores de plástico y tablas de corte. Investigación de *E. coli* O157, *Salmonella* spp, *Listeria* spp, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Recuento de mesófilos aerobios totales (RAM).

Etapas 2

Objetivo General

Evaluación de la velocidad de formación de biopelículas de cinco cepas bacterianas y sanitización a diferentes temperaturas y superficies.

Etapas 3

Objetivo General

Aplicación y verificación "*in situ*" (Comedor Universitario) del protocolo de sanitización elegido "*in vitro*".

Cada una de las etapas contará con el título de la etapa, objetivos, materiales y métodos, resultados obtenidos, la discusión de los mismos y conclusiones parciales. En último lugar estarán las conclusiones finales.

ETAPA 1

Formación de biopelículas en superficies de bandejas, contenedores de plástico y tablas de corte. Recuento de mesófilos aerobios.

Investigación de *E. coli* O157, *Salmonella* spp, *Listeria* spp, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Objetivos específicos

- Detectar biopelículas bacterianas sobre distintas superficies de contacto (bandejas, contenedores de plástico y tablas de corte) mediante la aplicación de una solución colorante de cristal violeta.
- Realizar recuentos de aerobios mesófilos (RAM) sobre las superficies que se hayan teñido con la solución de cristal violeta.
- Aislar bacterias patógenas e indicadores (*E. coli* O157, *Salmonella* spp, *Listeria* spp, *E. coli* y *P. aeruginosa*) que hayan desarrollado sobre las superficies de contacto teñidas para ser utilizadas en el bioensayo.

Materiales y métodos

i. Superficies estudiadas

Las superficies estudiadas fueron: bandejas de servicio de acero inoxidable (AI) de calidad AISI 304 (foto 2), contenedores de comida de polietileno de alta densidad y alto peso molecular (PEAD) (foto 3) y tablas de corte de PTFE Teflón® (politetrafluoroetileno) (foto 4).

Foto 2: Bandeja de AI.



Foto 3: Contenedor de PEAD.



Foto 4: Tabla de PTFE.



ii. Método de tinción para la detección de biopelículas

Se utilizó la técnica de tinción de cristal violeta al 1 %, que consistió en la aplicación de 3 gotas de la solución colorante sobre la superficie seca (aprox. 1,5 cm x 1,5 cm) de Al, PEAD y PTFE. Las superficies fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido se realizaron lavados con jeringa de 50 ml con agua destilada estéril (150 ml) (foto 5). La presencia de color azul en la superficie después de los lavados fue utilizada como “indicador” para la toma de muestra y se consideró como tinción “positiva” (Peeters y col., 2007).

Se realizaron tinciones (en Al, PEAD y PTFE) hasta observar macroscópicamente el color azul como indicador de una tinción positiva en 20 superficies. Para Al se realizaron 133 tinciones, para PEAD 57 tinciones y para PTFE 50 tinciones.

El cristal violeta es un colorante básico que se une a moléculas con carga negativa en su superficie y a los polisacáridos de la matriz extracelular, muy utilizado para estimar la biomasa de biopelículas (Gómez y col. 2013, Martínez Díaz y col., 2010).

Foto 5: Tinción positiva con cristal violeta al 1 % en Al (bandeja de servicio).



iii. Muestreo para el estudio microbiológico

Las muestras se extrajeron del Comedor Universitario de la UNLP (Sede 1) Bosque Oeste, calle 50 y 116, La Plata, Buenos Aires, Argentina. Método de toma de muestra para el estudio microbiológico: las muestras fueron obtenidas de superficies secas, post aplicación del protocolo de Limpieza y Desinfección. Se utilizó hisopado doble (Britania, Buenos Aires, Argentina) en 5 ml de caldo Lethen (Britania, Buenos Aires, Argentina). En cuanto a la técnica de hisopado, primero se utilizó el hisopo seco, apoyando y deslizando de un lado otro de la superficie, 10 veces de arriba hacia abajo; giro del hisopo y otras 10 veces de lado a lado. Con el segundo hisopo esta vez húmedo con caldo Lethen (Britania, Buenos Aires, Argentina) se procedió de la misma forma. La superficie a estudiada fue de 25 cm² (5 x 5 cm). Ambos hisopos se depositaron en el mismo tubo y se consideró la misma muestra. Posteriormente se transportaron refrigerados al Laboratorio de Microbiología de Alimentos FCV-UNLP para el análisis (Valdez Duque B., 2008).

Se tomaron 24 muestras por día de trabajo. En detalle: 2 muestras para RAM, 2 muestras para el aislamiento de *Salmonella* spp, 2 muestras para el aislamiento de *Listeria* spp y 2 para el aislamiento de *E. coli* O157.

Para determinar la presencia de *E. coli* O157 (20 muestras), *Salmonella* spp (20 muestras) y *Listeria* spp (20 muestras) se hisoparon

20 placas de acero inoxidable, 20 contenedores plásticos y 20 tablas de PTFE con coloración visible de cristal violeta.

iv. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (RAM)

Se utilizó el método horizontal “Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en superficie” según la *International Standard Organization* ISO 4833-2:2013 en ANMAT (2014). Inoculación e incubación: del tubo de ensayo con 5 ml y los dos hisopos, se agitaron durante 1 minuto con vortex Vicking mod. 6005 (Vicking, Buenos Aires, Argentina) y se transfirieron por duplicado 0,1 ml a placas de Petri con Agar Recuento en Placa (ARP, Britania, Buenos Aires, Argentina) y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Para el recuento de UFC en superficies se utilizó la fórmula 1 (recuento de unidades formadoras de colonia en superficies). Los resultados se informan: número de microorganismos por cm² (Instituto de Salud Pública, Chile. Procedimiento recuento de microorganismos por método de torunda en superficie, 2008).

Fórmula 1: Recuento de unidades formadoras de colonias en superficie.

$$N^{\circ} UFC/cm^2 = \frac{N^{\circ} UFC \times ml. Diluyente}{superficie \text{ \AA} rea}$$

- N° UFC: Número de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado.
- ml. diluyente: cantidad de mililitros que se diluye la muestra.
- Superficie del área: centímetros de área muestreada

a. Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp

Se utilizó el procedimiento según ISO 6579:2002 en metodología analítica oficial microorganismos patógenos volumen 1 ANMAT (2011).

a) Pre-enriquecimiento: los hisopos se sumergieron en 10 ml de agua Peptonada Bufferada (Britania, Buenos Aires, Argentina) y se incubaron a 37°C, 18 horas. Seguido, se inoculó 0,1ml en 10 ml de caldo Caldo Rappaport – Vassiliadis con soja (RVS, Biokar-Diagnostics, Francia) y 1 ml en 10 ml de Caldo Müller – Kauffmann tetrionato más novobiocina (MKTTn, Biokar-Diagnostics, Francia), se incubó a 37°C durante 18 horas.

b) Aislamiento: una ansada de RVS y MKTTn se sembró por agotamiento en la superficie del agar XLD (xilosa, lisina y desoxicolato, Biokar-Diagnostics, Francia) y en XLT4 (xilosa, lisina y tergitol, Biokar-Diagnostics, Francia). Las placas se incubaron a 37°C, 24 horas. Se seleccionaron colonias típicas, se estriaron en agar nutritivo (Britania, Buenos Aires, Argentina) incubándolas a 37°C, 24 horas.

c) Confirmación bioquímica: se utilizó el agar TSI (Agar-hierro-triple azúcar, Britania, Buenos Aires, Argentina) y agar LIA (agar Lisina Hierro, Britania, Buenos Aires, Argentina) la inoculación se realizó con aguja en forma de punción en el fondo y estriado en el pico de flauta. Se incubó a 37°C durante 24 horas (ANMAT, 2011). Para confirmación serológica se utilizó *RapidChek® SELECT™* (Sdix, Strategic Diagnostics Inc. 111 Pencader Drive Newark, USA).

b. Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* O157

Se utilizó el procedimiento según USDA/FSIS:2010 en metodología analítica oficial microorganismos patógenos volumen 1 ANMAT (2011).

Pre-enriquecimiento y tamizaje: a) los hisopos se sumergieron en 10 ml de TSBm más novobiocina 20 µg/ml (Acumedia Manufacturers, EE.UU.) y se incubaron de 15 a 22 horas a 42°C ± 1°C. b) tamizaje: se utilizó *E. coli* O157 test kit (DuPont, Wilmington, USA).

c. Aislamiento e identificación de *E. coli*

A partir del medio Lethen que contenía los hisopos para el RAM se extrajo 0,1 ml y se sembró en superficie en el medio EMB (Britania, Buenos Aires, Argentina) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se extrajeron cinco colonias que mostraban características compatibles a *E. coli*, y se inocularon en agar TSA (Britania, Buenos Aires, Argentina) y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se les realizó las pruebas de indol (positivo), rojo de metilo (positivo), Vogues-Proskauer (negativo) y citrato de Simmons (negativo) (Jay 1994, FDA-BAM 2002). A la cepa de *E. coli* aislada se le realizó el siguiente estudio: a partir del estriado por agotamiento en agar TSA (Britania, Buenos Aires, Argentina) se extrajo una colonia y se diluyó en 1 ml de solución fisiológica, seguido se aplicó la técnica de Separación Inmuno-magnética (ANMAT, 2011) y posterior siembra en estría por agotamiento en placas de agar MacConkey sorbitol suplementado con telurito de potasio y cefixime (SMAC-CT, Acumedia Manufactures, EEUU) y agar SD-39 (Acumedia

Manufactures Inc.). Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Seguido se seleccionaron 5 colonias típicas y se sembraron en una placa de SMAC-CT incubando durante 24 horas a 37°C. El ADN se extrajo por ebullición a 100°C durante 15 minutos, en 150 µl de buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X [10 mM TrisHCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)]. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 5 minutos para sedimentar los restos celulares. Los extractos de ADN fueron analizados por PCR múltiple para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157*. Para identificar la colonia *stx/rfbO157* se analizó por PCR múltiple. Se utilizaron tres pares de oligonucleótidos cebadores, un par para amplificar un fragmento del gen *stx1*, correspondiente a la subunidad B de la toxina *stx1*, otro par amplifica un fragmento del gen *stx2*, correspondiente a la subunidad A de *stx2* y el tercer par de cebadores que amplifican un fragmento del gen *rfbO157* correspondiente a una proteína involucrada en la síntesis del LPS O157. Como control positivo se utilizó una cepa control *E. coli* EDL933 (Moredo F., 2012; Brusa V., 2016).

d. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

A partir del medio Lethen, se extrajo 0,1 ml y se sembró en Caldo Asparagina (Anhedra, Buenos Aires, Argentina) y se incubó a 37°C por 24-48 horas. Los cultivos con crecimiento bacteriano, fueron transferidos a Agar Cetrimide (Britania, Buenos Aires, Argentina), e incubados por 24-48 horas a 37°C (APHA, 2005). Las cepas aisladas se conservaron en

caldo tripticasa soya (Britania, Buenos Aires, Argentina) adicionado con 20% de glicerol a la temperatura de -80°C.

e. Aislamiento e identificación de *Listeria* spp.

Se utilizó el procedimiento según ISO 11290-1:2004 en metodología analítica oficial microorganismos patógenos volumen 1 ANMAT (2011). Un mililitro de cada grupo de 10 se depositó en un tubo con 10 ml de enriquecimiento “primario” o pre-enriquecimiento con caldo Fraser a la mitad de la concentración (Acumedia, Manufacturers, EE.UU.) y se incubó 24 horas a 30°C. Seguido se inocularon 0,1 ml de cultivo en 10 ml de caldo Fraser (para el enriquecimiento “secundario”). Una vez terminada la incubación se sembró en superficie sobre los medios agar *Listeria* de acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) y PALCAM (Acumedia, Manufacturers, EE.UU.). Para la identificación de *Listeria* spp. se realizó la prueba de catalasa, Coloración de Gram, Prueba de la movilidad, Test de hemólisis, Utilización de carbohidratos (ramnosa y xilosa).

Resultados

i. Detección de biopelículas por medio de cristal violeta.

El porcentaje de tinciones positivas encontradas en Al fue del 15% (20 bandejas positivas de un total de 133), en PEAD fue del 35% de los contenedores (20 positivos de una total de 57) y en las tablas de PTFE fue del 40% (20 positivos de un total de 50).

La coloración se pudo detectar macroscópicamente hasta una concentración bacteriana de 1,61 log UFC/cm². En concentraciones menores no se pudo visualizar macroscópicamente la coloración azul.

ii. Recuentos de aerobios mesófilos (RAM)

Los RAM obtenidos de las superficies teñidas con cristal violeta en las bandejas de Al se muestran en tabla 1.

Los valores logarítmicos finales de cada muestra figuran en el gráfico 1. El valor promedio de las 20 muestras analizadas fue de 2,39 log UFC/cm², donde el mayor valor fue 3,1 log UFC/cm² (muestra N° 18) y el menor 1,61 log UFC/cm² (muestra N° 19).

Tabla 1: Resultados de los RAM de las 20 muestras de AI.

N° Muestra	1°Recuento	2°Recuento	Promedio	N°UFC/cm ²	Log (N°UFC/cm ²)
1	4000	4800	4400	880	2,94
2	4000	6200	5100	1020	3,01
3	230	560	395	79	1,90
4	400	1100	750	150	2,18
5	1900	3500	2700	540	2,73
6	1300	1700	1500	300	2,48
7	400	600	500	100	2,00
8	500	650	575	115	2,06
9	190	240	215	43	1,63
10	280	230	255	51	1,71
11	5700	6300	6000	1200	3,08
12	3800	4100	3950	790	2,90
13	330	240	285	57	1,76
14	4900	3700	4300	860	2,93
15	6100	4800	5450	1090	3,04
16	500	700	600	120	2,08
17	2550	2760	2655	531	2,73
18	4500	8900	6700	1340	3,13
19	300	110	205	41	1,61
20	350	600	475	95	1,98

Los RAM obtenidos de las superficies teñidas con cristal violeta en los contenedores de comida de PEAD se muestran en tabla 2.

Los valores logarítmicos finales en PEAD se muestran en el gráfico 1 (b). El valor promedio de las 20 muestras analizadas fue de 4,88 log UFC/cm², donde el mayor valor fue log 5,23 log UFC/cm² y el menor log 4,04 log UFC/cm².

Los valores logarítmicos finales en PTFE se muestran en el gráfico 1 (c). El valor promedio de las 20 muestras analizadas fue de 5,33 log UFC/cm², donde el mayor valor fue log 6,20 log UFC/cm² y el menor log 4,90 log UFC/cm².

Tabla 2: Resultado de los RAM de las 20 muestras de PEAD.

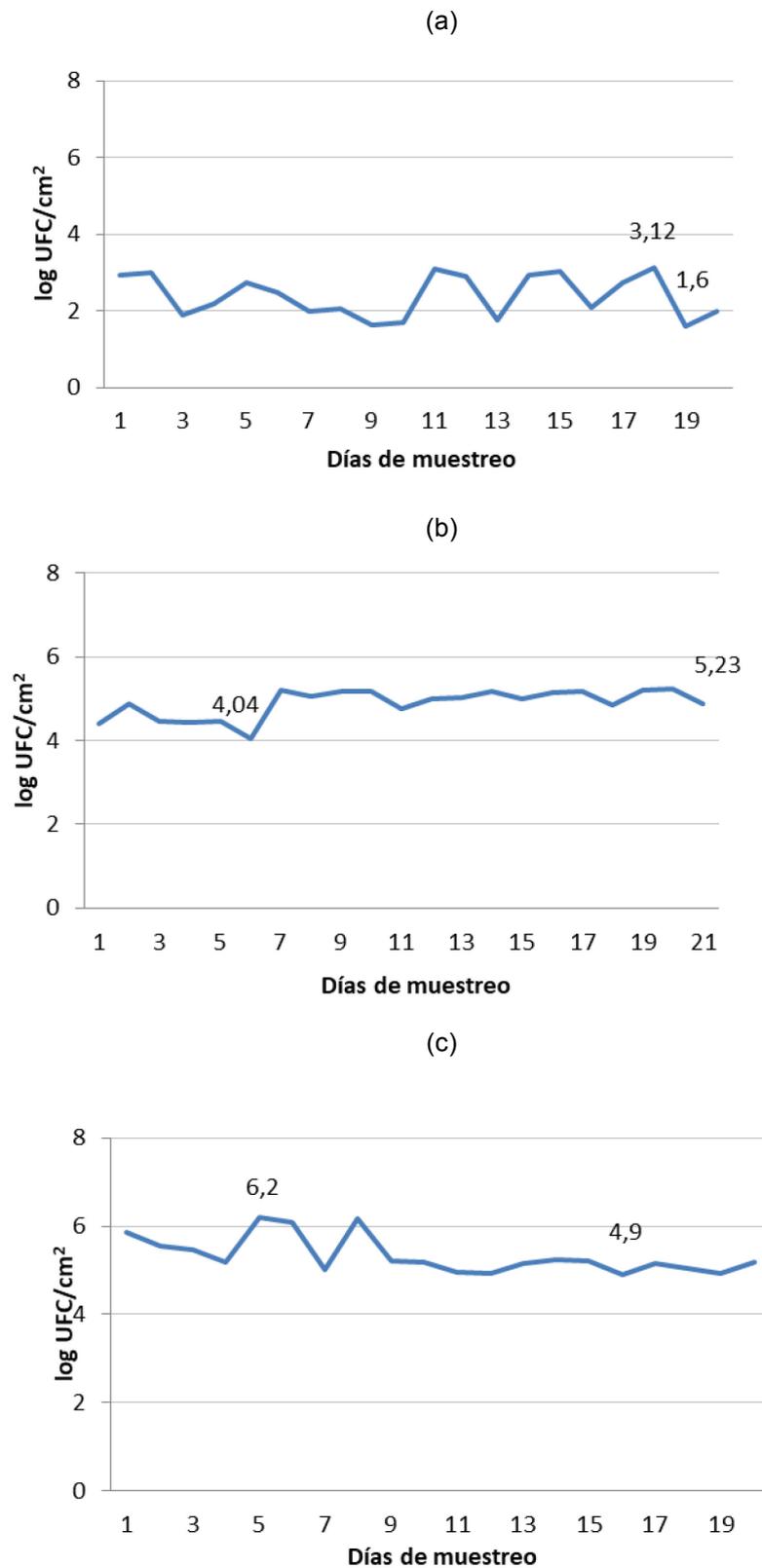
N° Muestra	1°Recuento	2°Recuento	Promedio	N°UFC/cm ²	Log (N°UFC/cm ²)
1	141000	110000	125500	25100	4,40
2	830000	630000	365000	73000	4,86
3	139000	144000	141500	28300	4,45
4	110000	156000	133000	26600	4,42
5	234000	320000	146000	29200	4,47
6	430000	680000	55500	11100	4,05
7	690000	940000	815000	163000	5,21
8	350000	750000	550000	110000	5,04
9	950000	560000	755000	151400	5,18
10	680000	830000	755000	151000	5,18
11	215000	358000	286500	57300	4,76
12	510000	460000	485000	97000	4,99
13	650000	430000	540000	108000	5,03
14	750000	740000	745000	149000	5,17
15	460000	540000	500000	100000	5,00
16	650000	700000	675000	135000	5,13
17	670000	840000	755000	151000	5,18
18	320000	360000	340000	68000	4,83
19	840000	750000	795000	159000	5,20
20	940000	780000	860000	172000	5,24

Los RAM obtenidos de las superficies teñidas con cristal violeta en tablas de PTFE se muestran en tabla 3.

Tabla 3: Resultado de los RAM de las 20 muestras de tablas de PTFE.

N° Muestra	1°Recuento	2°Recuento	Promedio	N°UFC/cm ²	Log (N°UFC/cm ²)
1	3000000	4200000	3600000	720000	5,86
2	1970000	1630000	1800000	360000	5,56
3	1010000	1940000	1475000	295000	5,47
4	900000	630000	765000	153000	5,18
5	7500000	8700000	8100000	1620000	6,21
6	5400000	6800000	6100000	1220000	6,09
7	460000	560000	510000	102000	5,01
8	6500000	8400000	7450000	1490000	6,17
9	730000	950000	840000	168000	5,23
10	650000	850000	750000	150000	5,18
11	280000	650000	465000	93000	4,97
12	520000	320000	420000	84000	4,92
13	650000	740000	695000	139000	5,14
14	850000	940000	895000	179000	5,25
15	950000	640000	795000	159000	5,20
16	450000	360000	405000	81000	4,91
17	680000	740000	710000	142000	5,15
18	350000	750000	550000	110000	5,04
19	680000	158000	419000	83800	4,92
20	840000	650000	745000	149000	5,17

Gráfico 1: Valores de RAM en Log UFC/cm² obtenidos a partir de hisopados en (a) AI, (b) PEAD, (c) PTFE.



iii. Análisis microbiológicos de *E. coli*, *P. aeruginosa* *E. coli* O157, *Salmonella* spp y *Listeria* spp.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: se aisló una cepa de *E. coli* a partir de la superficie del contenedor de PEAD N° 9, esta cepa resultó negativa a la metodología de identificación para *E. coli* O157. Se aisló también una cepa de *P. aeruginosa* a partir de la superficie del contenedor de PEAD N°5.

Los análisis microbiológicos para evidenciar la presencia de *E. coli* O157, *Salmonella* spp y *Listeria* spp arrojaron resultados negativos en todas las superficies estudiadas.

Discusión

Los microorganismos que se encuentran formando biopelículas en las superficies son la principal causa de contaminación del producto final, pudiendo producir ETA (Piera Serra, 2003; Tellez S, 2010). Esto también resulta de gran interés debido al deterioro que causan en el alimento, que se traduce como una gran pérdida económica (Chmielewski y col., 2003; FAO 2008; Fuster i Valls N. 2006; Tellez S. 2010).

La formación de biopelículas en Al, PEAD y PTFE se encuentra ampliamente informada. Varios autores identificaron y reprodujeron biopelículas de gran cantidad de especies bacterianas en vidrio, Al, diferentes polímeros, etc. (Bonsaglia y col., 2014; Di Bonaventura y col., 2008).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirmarían que estos eventos de organización bacteriana se pueden encontrar en diferentes lugares y tipos de procesos. Su probabilidad de aparición es muy alta, muestran gran resistencia a los métodos de limpieza y desinfección y más importante: el riesgo que significan para la salud de los consumidores (Bonsaglia y col., 2014; Di Bonaventura y col., 2008; Dantas Espadas y col., 2014).

La tinción con cristal violeta es muy utilizada para la cuantificación de biopelículas en placas de microtitulación (De los Santos Villamil, 2012; Xu y col., 2016; Peeters y col., 2008). En este trabajo se utilizó con la finalidad de identificar biopelículas que pudieran estar presentes en las

superficies en contacto con alimentos. El objetivo fue obtener una herramienta de identificación rápida, de fácil aplicación, accesible en costos e inocua para los alimentos.

Los resultados obtenidos indicaron que todas las muestras extraídas de los lugares donde se observó la presencia del colorante, presentaron una alta concentración bacteriana.

Se podría interpretar entonces que el uso del colorante fue efectivo en la detección de biopelículas. Los análisis microbiológicos indicaron en todos los casos la presencia de biopelículas.

En los 20 análisis microbiológicos realizados en cada superficie, el color azul fue detectado macroscópicamente hasta una concentración de $1,61 \log \text{UFC}/\text{cm}^2$. Por lo tanto, su utilización estaría muy discutida ya que no se pudo detectar el color azul en valores inferiores a $41 \text{UFC}/\text{cm}^2$ (valor obtenido con la fórmula 1). Esto toma relevancia ya que esta cantidad supera ampliamente el valor recomendado de $10 \text{UFC}/\text{cm}^2$.

Los resultados de los RAM superaron significativamente los valores de referencia para superficies en contacto con alimentos en la etapa pre operatoria que indica la Circular 4176 del SENASA (2015), la Directiva L 165/48 (Comunidad Económica Europea, 2001) la Directiva de la CE 471/2001 (Directiva 471, 2001) y la resolución 336/2016 del Ministerio de Agroindustria (Ministerio de Agroindustria, SENASA, 2016).

Una de las causas que provocó el desvío en los RAM fue la presencia de rugosidades en las superficies, producidas por el intenso

uso. Estas rugosidades son capaces de retener sustancias orgánicas y formar una “membrana de acondicionamiento” que finalmente facilitaron la adhesión bacteriana y por lo tanto, favorecieron la formación de las biopelículas (Van haecke E., 1990; Kusumaningrum H., 2003; Whitehead K., 2005; Garret T., 2008; Myszkka K., 2011; Díaz C., 2011).

Otra de las causas que originaron los desvíos, fueron las fallas en la aplicación del lavado y la desinfección de las superficies estudiadas (Ruiz Bolívar y col. 2008). Esto generó una “no conformidad” y la aplicación de acciones correctivas dirigidas a: 1. Controlar rápidamente la contaminación de superficies mediante la aplicación de un protocolo de limpieza y desinfección de contingencia. 2. Capacitación del personal: Se organizó una reunión en la cual se dictó una capacitación en forma teórica como práctica (ANMAT 2018; Cabrera J., 2013; SENASA 2016; Pennimpede y col., 2003).

Los aislamientos de *E. coli* y *P. aeruginosa* en la superficie de PEAD han sido descritos por varios autores (Van Houdt R., 2010; Tellez S., 2010; Beauchamp C., 2012; Siryaporn A., 2014).

La presencia de biopelículas en las 3 superficies estudiadas desencadenó una alarma que activó una rápida acción correctiva dirigida al control de la contaminación y a realizar estudios “*in vitro*” e “*in situ*” para diseñar una nueva estrategia dirigida al control y prevención de las biopelículas (Pennimpede y col., 2003; Reid y col., 2011; FAO 2016).

Conclusiones parciales

- La tinción con cristal violeta fue de utilidad cuando la concentración bacteriana de la biopelícula fue igual o superior a 1,61 log UFC/cm². Por debajo de esta concentración no fue posible identificar el color azul en forma macroscópica.
- La presencia de biopelículas en estas superficies indicó una falla en la aplicación de la limpieza y desinfección.
- Se debe implementar un control estricto del desgaste de las superficies de utensilios para no favorecer la retención de sustancias orgánicas.
- Es necesario desarrollar un Proceso Operativo de Sanitización cuyos resultados no superen los límites microbiológicos establecidos.

ETAPA 2

Velocidad de formación de biopelículas de cinco cepas bacterianas y sanitización a diferentes temperaturas y superficies.

Objetivos específicos

- Implementar un bioensayo a tres temperaturas y en superficies diferentes para evaluar la velocidad de formación de biopelículas de las distintas especies bacterianas involucradas.
- Aplicar diferentes protocolos de sanitización sobre las 3 superficies con biopelículas desarrolladas en 3 temperaturas “*in vitro*”.

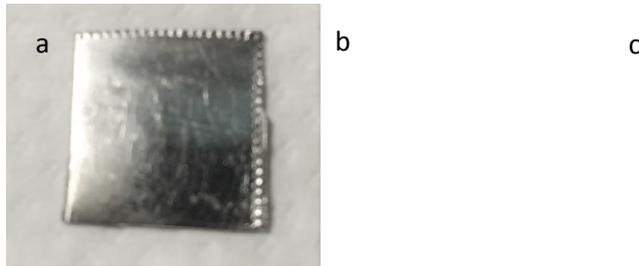
Materiales y Métodos

i. Superficies utilizadas para evaluar el desarrollo de las biopelículas

Bandejas de Al, Contenedores de PEAD y tablas de corte de PTFE.

Se realizaron cortes de 1,5 x 1,5 cm de lado, cuya superficie fue de 2,25 cm² (Foto 6).

Foto 6: Cortes de Al (a), PEAD (b) y PTFE (c).



La esterilización de las superficies se realizó por medio de autoclave, a 121°C durante 15 minutos. Las temperaturas de incubación fueron: 3, 10 y 25°C.

ii. Aislamientos bacterianos utilizados para el bioensayo

1- Cepas bacterianas aisladas en el estudio microbiológico.

- *Escherichia coli*: Bacteria indicadora de contaminación por materia fecal de origen humano o animal en forma directa o indirecta, no diarreogénica y aislada de un contenedor de PEAD.

- *Pseudomonas aeruginosa*: Bacteria considerada patógeno oportunista y alterador de alimentos, aislada de un contenedor de PEAD.
- 2- Cepas bacterianas de origen externo, provenientes de carnicerías abastecidas por los mismos proveedores mayoristas que entregan carne al Comedor Universitario.
- *Escherichia coli* O157 (aislada de la superficie de una máquina de moler carne bovina) no portadora de los genes STEC, perteneciente al cepario del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos e identificada con el número 1035.
 - *Salmonella* spp (aislada de la superficie de un cuchillo de carnicero) perteneciente al cepario del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos FCV-UNLP e identificada con el número 679.
 - *Listeria* spp (aislada de superficie de una tabla de PTFE) perteneciente al cepario del Laboratorio de Microbiología de los de los Alimentos FCV-UNLP e identificada como L9.

iii. Preparación de cada inóculo

Las cinco cepas se sembraron en 5 ml de caldo Luria Bertami (LB, Probiotek, México) y se incubaron toda la noche a 35°C. Posteriormente 0,1 ml de cada suspensión, se inoculó en la superficie del Agar MacConkey con sorbitol (Britania, Buenos Aires), Agar XLT4 (Acumedia, Manufacturers, EE.UU.), Agar Palcam (Acumedia, Manufacturers, EE.UU.), Agar EMB (Britania, Buenos Aires, Argentina) y Agar Cetrimide

(Britania, Buenos Aires, Argentina) incubándose durante toda la noche a 35°C.

A partir de una colonia con características morfológicas compatibles a cada especie bacteriana, se tomó una porción con ansa en punta y se sembró en caldo LB y se incubó a 35°C durante 24 horas.

El inóculo que se utilizó para el experimento fue 1 ml de una concentración bacteriana $10^3 - 10^4$ UFC/ml (Silagyi y col., 2007; Ryu y col., 2004).

iv. Preparación de los Bioensayos

En tubos de vidrio de 22 mm de ancho se depositaron 10 ml de caldo LB con la superficie a estudiar de 1,5 x 1,5 cm. Se calibró el pH en 7,2 y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. Antes de comenzar los ensayos los tubos que contenían las superficies se depositaron 48 horas a las temperaturas fijadas (3, 10 y 25°C) para no modificar comportamiento bacteriano (Foto 7).

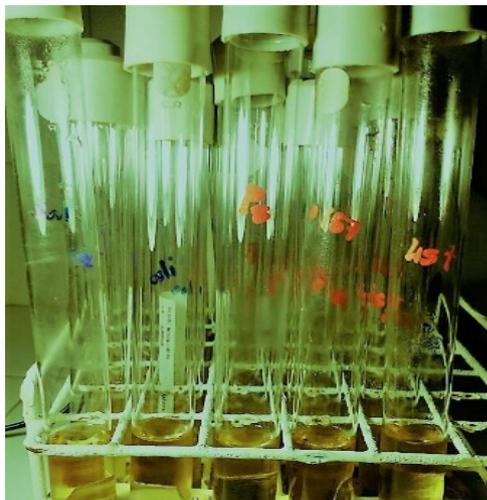
La metodología utilizada para realizar los ensayos se describe en la tabla 4.

Tabla 4: Resumen de la metodología utilizada para los bioensayos con las cinco cepas bacterianas en 3 superficies y en las tres temperaturas de incubación.

Cepas	Temperatura	Especificaciones de cada protocolo	
<i>Listeria</i> spp <i>P.aeruginosa</i>	3 °C	Tiempo de Incubación: 8 días	
		Superficie	Tiempo de toma de muestra (horas)
		Al	
		PTFE	3 6 12 48 72 96 120 192
		PEAD	
		Cantidad de tubos con 10 ml LB/superficie: 8x3 superficies x2 cepas. (n= 48)	
<i>E. coli</i> O157 <i>Salmonella</i> spp <i>E. coli</i>	3 °C	Tiempo de Incubación: 10 días	
		Superficie	Tiempo de toma de muestra (horas)
		Al	
		PTFE	12 24 48 72 96 144 192 240
		PEAD	
		Cantidad de tubos con 10 ml LB/superficie: 8x3 superficies x3 cepas. (n=72)	
<i>E. coli</i> O157 <i>Salmonella</i> spp <i>E. coli</i> <i>Listeria</i> spp <i>P.aeruginosa</i>	10 °C	Tiempo de Incubación: 8 días	
		Superficie	Tiempo de toma de muestra (horas)
		Acero Inoxidable	
		PTFE	3 6 12 24 48 96 144 192
		PEAD	
		Cantidad de tubos con 10 ml LB/superficie: 8x3 superficies x5 cepas. (n=120)	
<i>E. coli</i> O157 <i>Salmonella</i> spp <i>E. coli</i> <i>Listeria</i> spp <i>P. aeruginosa</i>	25 °C	Tiempo de Incubación: 8 días	
		Superficie	Tiempo de toma de muestra (horas)
		Al	
		PTFE	3 6 12 24 36 48 60 72
		PEAD	
		Cantidad de tubos con 10 ml LB/superficie: 8x3 superficies x5 cepas. (n=120)	

Control de temperaturas: se realizó utilizando el termómetro registrador marca Testo (modelo 177-74 logger, Buenos Aires, Argentina) en una estufa termostatic Cabinet Lovibond (Lovibond, Amesbury, England) con un intervalo de temperatura de 2 a 45°C.

Foto 7: Tubos 22 mm con 10 ml de LB, conteniendo superficies de acero inoxidable listas para incubar.



v. Toma de muestra y procesado

La superficie incubada en LB se trasladó a un tubo con 10 ml de solución fisiológica (SF) y se le realizaron 4 lavados de 15 segundos con un agitador vortex Viking modelo 6005 (Viking, Buenos Aires, Argentina). Se extrajo la superficie con una pinza Kocher y se realizó un hisopado doble en una cara. Antes de la inoculación en medio sólido, los hisopos fueron mezclados durante 1 minuto (Figura 8). Con la otra cara de la superficie incubada durante 3 y 6 horas, se realizó una impronta sobre la superficie de ARP (Britania, Buenos Aires, Argentina) y se incubó a 35°C durante 48 horas (Foto 8).

Figura 8: Obtención y procesado de la muestra de la superficie con biopelícula.

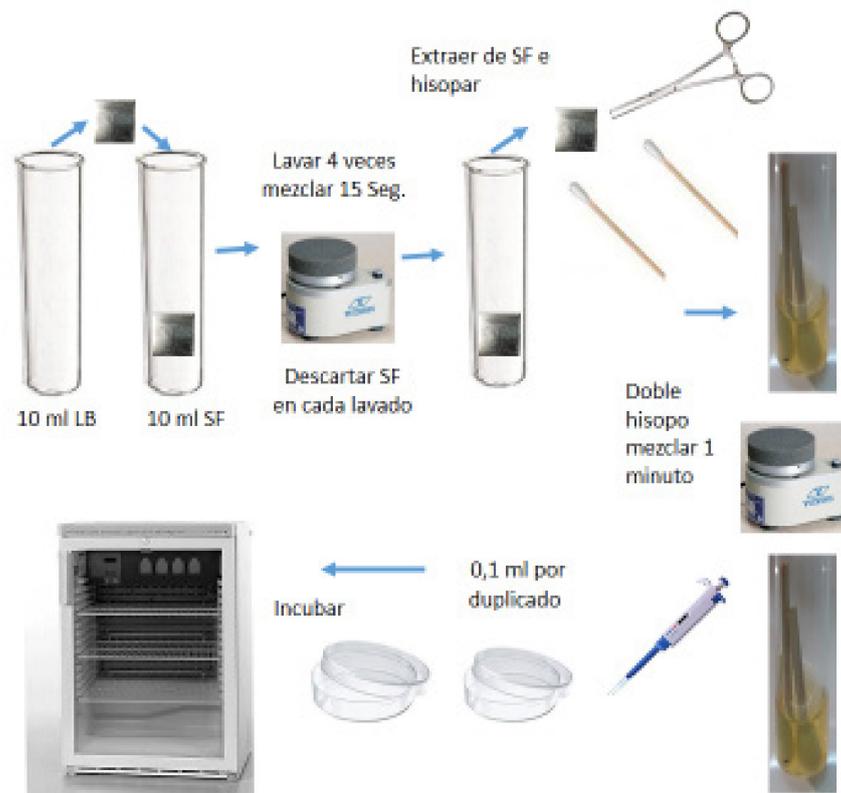
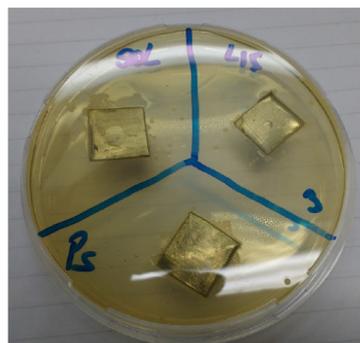


Foto 8: Impronta de la superficie cultivada en medio sólido.



vi. Método de cuantificación de bacterias viables

Se utilizó el método microbiológico de recuento de bacterias viables aerobias sobre una superficie (UFC/cm²) de agar ARP (Pág. 59) (Li y col., 2014; ANMAT 2014; Azeredo y col., 2017).

Recuentos bacterianos: del caldo Leethen con los hisopos ya mezclados por 1 minuto, se realizaron diluciones en base 10 y se inoculó 0,1 ml en la superficie del medio ARP (ANMAT, 2014).

vii. Método de tinción

Se utilizó la técnica de tinción de cristal violeta al 1 % que consistió en la aplicación de 1 ml de solución colorante sobre la superficie seca de Al, PEAD y PTFE. Estas, fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido se realizaron 3 lavados (150 ml). La persistencia del color azul en la superficie después de los lavados se consideró positivo a la presencia de una biopelícula (Peeters y col., 2008). A las superficies que se aplicó el colorante se las clasificó en tres categorías:

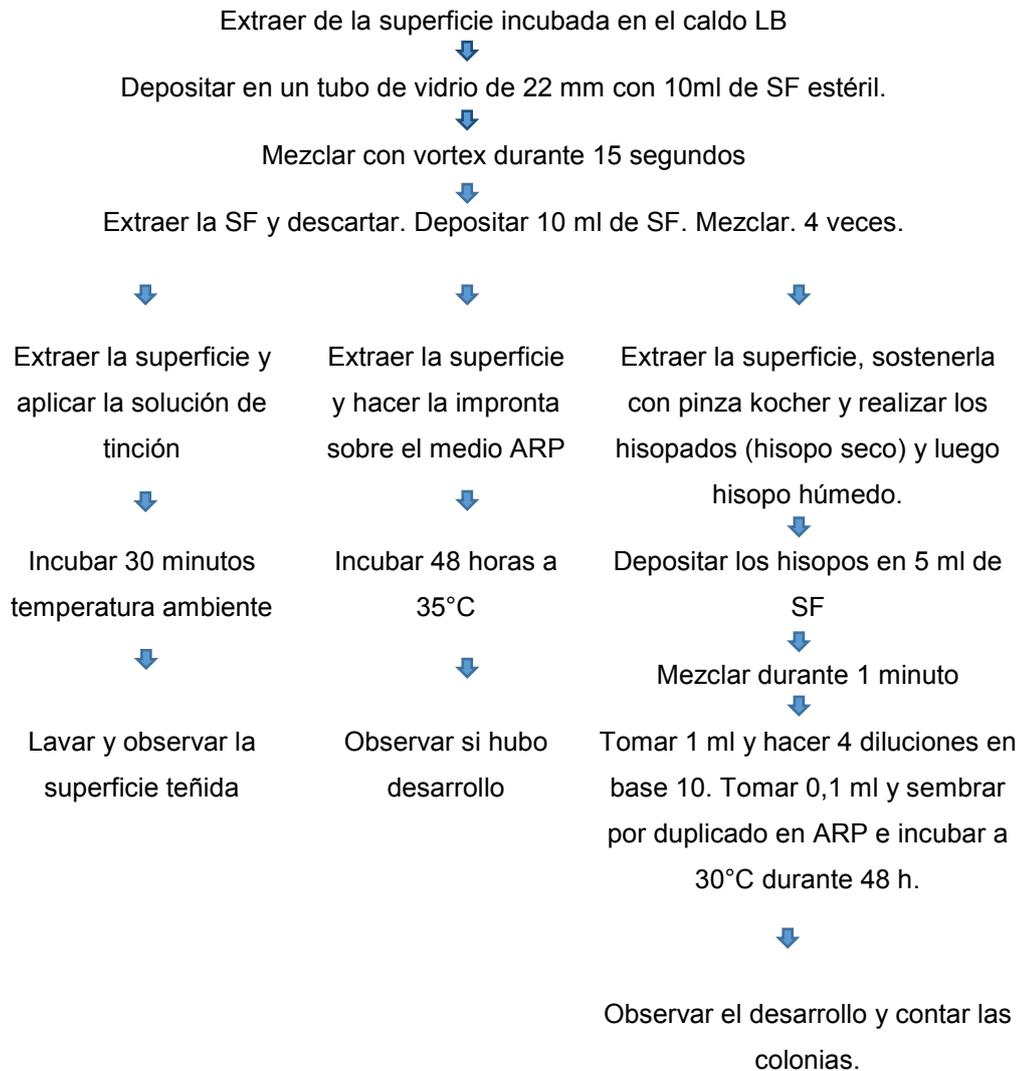
Categoría 0 = ningún rastro de colorante

Categoría 1 = teñido difuso

Categoría 2 = teñido total de superficie

viii. Resumen de la toma de muestra y procesado de las superficies con biopelículas (Figura 9).

Figura 9: Resumen del proceso completo (toma de muestra, procesado de superficies y tinción).



ix. Modelado Matemático del desarrollo Microbiano. Modelo de Gompertz

Los modelos matemáticos pueden ser empleados para predecir los efectos sobre la vida útil de los alimentos en base a diferentes combinaciones tiempo - temperatura durante su producción y distribución. Cuando los modelos matemáticos son validados es porque se han realizado una amplia gama de estudios pertinentes acerca de cómo influyen los agentes intrínsecos y extrínsecos en la matriz. Con los resultados de los estudios se puede predecir el comportamiento de los microorganismos en los alimentos. El modelo utilizado en este trabajo es el de Gompertz, considerado de nivel primario y describe los cambios en el número de microorganismos en función del tiempo bajo ciertas condiciones ambientales (Whiting y col., 1995; Coll Cárdenas F., 2005; Copes J. 2005; Pellicer K. 2011; Talero García M., 2019;).

La ecuación modificada de Gompertz (*ecuación 1*) (Gibson y col., 1989; Zwietering y col., 1990).

$$\text{Log } N = a + c \cdot \exp(-\exp(-b(t - m))) \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde: **Log N** es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos [Log (UFC/g)] al tiempo t, dado en días. **a** es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivale al Log de los niveles iniciales de bacterias) [Log (UFC/g)]. **c** es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos Log de

crecimiento) [Log (UFC/g)]. m es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento [días]. b es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo m [días⁻¹]. De estos parámetros, se derivan la velocidad específica de crecimiento ($\mu=b.c/e$) [Log(UFC/cm²)/días], (con $e=2,7182$). La duración de la fase de latencia (LPD= $m-1/b$) [días] y la máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares (MPD= $a + c$) [LogUFC/g]. Estos parámetros son específicos para cada microorganismo y su ambiente. La ecuación fue ajustada a los datos del desarrollo microbiano mediante una regresión no lineal con el programa Sigma Plot versión 11.0 (Systat, Inc). El programa ajusta los datos a la curva sigmoidea, o sea que calcula los parámetros de acuerdo a un determinado criterio. Los parámetros a , c , b y m son estimados, para obtener un modelo matemático completo del cual, una curva de crecimiento podría ser predicha para cualquier combinación de condiciones dentro de los límites del experimento. Otros parámetros de interés como la fase de latencia, pueden derivarse entonces de la curva de predicción (Chang, 1998; Coll Cárdenas, 2005; Gianuzzi y col., 1991; Gianuzzi L, 1998).

La aplicación de estas ecuaciones a los resultados obtenidos en la formación de biopelículas en las diferentes superficies fue netamente experimental. El objetivo fue determinar si los datos se ajustaban al tipo de curva y en ese caso, obtener los parámetros derivados, velocidad específica de crecimiento y la máxima densidad poblacional.

x. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Infostat (Di Rienzo, 2018). Se empleó un nivel de significación de $p < 0.05$. Se utilizó el análisis de varianza para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de los recuentos obtenidos por todas las cepas con respecto a cada uno de las temperaturas (3, 10 y 25°C). Mientras que se evaluó a través la prueba de Chi cuadrado para determinar la proporción de superficie teñida y su relación con el crecimiento de las biopelículas en las distintas superficies.

xi. Aplicación de tres protocolos de limpieza y desinfección (LD).

Se desarrollaron tres protocolos de LD en los que se utilizaron productos químicos de fácil aplicación y acceso en el mercado local. Los procedimientos desarrollados se enfrentaron a las superficies con biopelículas con el mayor recuento bacteriano.

xii. Obtención de biopelículas destinadas para aplicar los 3 protocolos de LD. Concentraciones y tiempos de formación.

Las biopelículas utilizadas fueron realizadas con la misma metodología implementada anteriormente en este trabajo (puntos iv y v). Se planificó la incubación teniendo en cuenta los tiempos y las concentraciones de formación de biopelículas obtenidas anteriormente (punto v). La tabla 5 muestra los tiempos donde se observó la mayor concentración bacteriana de las distintas biopelículas.

Tabla 5: Concentraciones y tiempos de incubación de las cinco cepas donde se obtuvo el mayor recuento bacteriano.

Superficie	Cepas	Temperatura		
		3°C (log UFC/cm ² -horas)	10°C (log UFC/cm ² -horas)	25°C (log UFC/cm ² -horas)
AI	<i>Salmonella</i> spp.	2,22 - 192	4,10 - 96	5,91 - 36
	<i>E. coli</i> O157	2,27 - 96	5,29 - 96	7,92 - 36
	<i>E. coli</i>	2,79 - 96	3,83 - 144	5,93 - 36
	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	3,04 - 192	5,24 - 144	5,93 - 36
	<i>Listeria</i> spp.	3,08 - 192	5,41 - 96	7,00 - 48
PEAD	<i>Salmonella</i> spp.	2,30 - 192	6,20 - 48	6,81 - 48
	<i>E. coli</i> O157	2,76 - 96	5,90 - 48	7,77 - 48
	<i>E. coli</i>	2,93 - 72	4,89 - 96	7,48 - 48
	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	2,99 - 192	5,74 - 96	6,28 - 36
	<i>Listeria</i> spp.	3,07 - 192	5,93 - 96	6,81 - 48
PTFE	<i>Salmonella</i> spp.	2,44 - 192	6,06 - 48	5,55 - 48
	<i>E. coli</i> O157	2,36 - 240	6,25 - 48	7,79 - 48
	<i>E. coli</i>	2,79 - 72	5,00 - 96	7,48 - 48
	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	3,04 - 192	5,85 - 144	5,87 - 72
	<i>Listeria</i> spp.	3,08 - 192	4,95 - 96	6,13 - 48

Diseño experimental: se realizó un diseño factorial empleando tres temperaturas 3, 10 y 25°C.

- Para cada cepa se produjeron 5 biopelículas, hicieron un total de 25 biopelículas x 3 superficies: Total **75** biopelículas.
- Recuentos bacterianos: 75 biopelículas por duplicado: 150 recuentos por cada temperatura.
- Tinción: 1 biopelícula (cada aislamiento bacteriano): 5 superficies con biopelícula x 3 temperaturas: **15** tinciones.
- Total para las 3 temperaturas: 270 biopelículas (225 para recuentos bacterianos y 45 para tinción). Total de recuentos (por duplicado) 450.
- Total para las 3 LD: 810 biopelículas (675 para recuentos bacterianos y 135 para tinción). Total de recuentos (por duplicado) 1350.

A continuación se muestran las biopelículas (sin tinción) sobre Al antes de proceder al lavado y desinfección. La foto 9 muestra la biopelícula de *P. aeruginosa* a las 36 horas de incubación a 25°C. La foto 10 a *E. coli* O157 y la foto 11 a *Salmonella* spp. Ambas biopelículas con 96 horas a 10°C.

Foto 9: Biopelícula en acero inoxidable de *P. aeruginosa* (36 horas de incubación a 25°C).



Foto 10: Biopelícula en acero inoxidable de *E. coli* O157 (96 horas de incubación a 10°C).

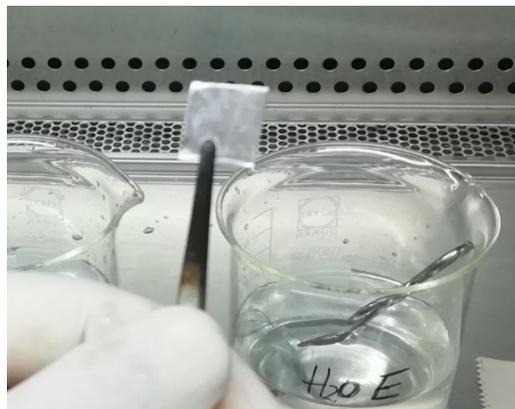


Foto 11: Biopelícula en acero inoxidable de *Salmonella* spp. (96 horas de incubación a 10°C).



a. Protocolos de Limpieza y Desinfección propuestos.

Protocolo LD1

- Enjuagar con agua potable esterilizada.
- Aplicar detergente neutro en dilución recomendada por el fabricante.
- Cepillar toda la superficie, 15 veces de arriba hacia abajo y 15 veces de lado a lado.
- Enjuagar con agua potable esterilizada.
- Aplicar la solución de **hipoclorito de sodio 400** ppm durante 15 minutos.
- Enjuagar con agua potable esterilizada.
- Secar con papel sanitario.
- Hisopar para la obtención de la muestra a examinar.
- Recuento bacteriano y teñido de superficie.

Protocolo LD2

- Enjuagar con agua potable esterilizada.
- Aplicar catolito en una dilución del 50%.
- Cepillar toda la superficie, 15 veces de arriba hacia abajo y 15 veces de lado a lado.
- Enjuagar con agua potable esterilizada.
- Aplicar la solución de **agua electroactivada al 100%** durante 15 minutos.
- Enjuagar con agua potable esterilizada.
- Secar con papel sanitario.
- Hisopar para la obtención de la muestra a examinar.
- Recuento bacteriano y teñido de superficie.

Protocolo LD3

- Enjuagar con agua potable esterilizada.
- Aplicar el detergente alcalino en dilución recomendada por el fabricante.
- Cepillar toda la superficie, 15 veces de arriba hacia abajo y 15 veces de lado a lado.
- Enjuagar con agua potable esterilizada.
- Aplicar la solución de **Ácido Acético** 2000 ppm durante 15 minutos.
- Enjuagar con agua potable esterilizada.
- Secar con papel sanitario.
- Hisopar para la obtención de la muestra a examinar.
- Recuento bacteriano y teñido de superficie.

b. Aplicación de la LD “*in vitro*”

En la Foto 11 se muestra el procedimiento de extracción de la superficie con biopelícula dentro de la cabina de bioseguridad (Sabella Modelo CFLV-SB, Buenos Aires, Argentina). Los tres protocolos presentan en común los siguientes pasos:

1. Humectar y cepillar con la solución detergente (Foto 13).
2. Enjuagar con agua potable estéril mediante agitación manual durante 30 segundos (Foto 14).
3. a. Desinfectar por inmersión a las superficies de Al y PTFE
b. Desinfectar por aspersion en PEAD.
4. Secar las superficies sobre papel absorbente (utilizado en el establecimiento) dentro de la cabina de bioseguridad (Foto 15 y 16).

5. Tomar la muestra con hisopado doble, y depositar en 5 ml de caldo Letheen (Britania, Buenos Aires, Argentina) (Foto 17).

La solución de detergente se realizó con agua potable esterilizada. Todo el material de vidrio y metal fue esterilizado en autoclave 121°C durante 20 minutos.

Todas las soluciones (detergentes y desinfectantes) se prepararon 30 minutos antes de utilizarlas.

Foto 12: Ubicación de los materiales para la extracción de la superficie.

Foto 13: Humectado y cepillado en contenedor plástico con la solución detergente.

Foto 14: Enjuagado en los vasos con agua potable estéril, durante 30 segundos.

Foto 15: Secado con papel absorbente dentro de la cabina de bioseguridad.

Foto 16: Secado con papel absorbente dentro de la cabina de bioseguridad.

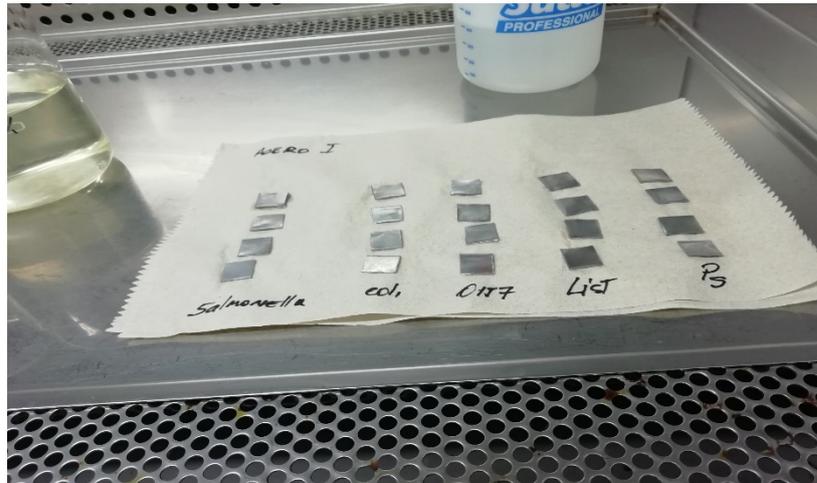
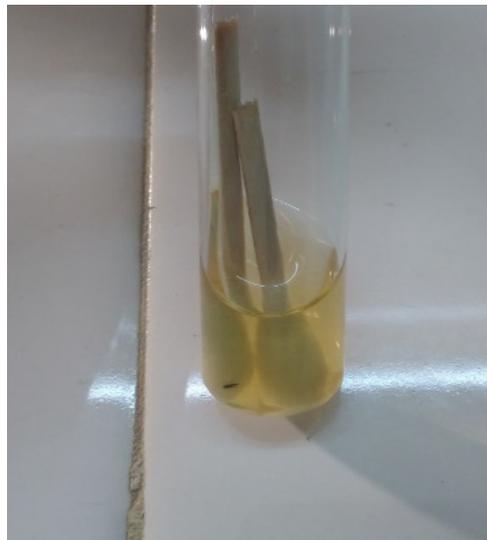


Foto 17: Toma de muestra con 2 hisopos en caldo Letheen.



Resultados

i. Formación de biopelículas a 3°C

a. Incubación de *P. aeruginosa* y *Listeria* spp.

- AI

Los resultados de la concentración bacteriana en AI en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 2 (a). Donde *P. aeruginosa* mostró la menor concentración bacteriana a las 3 horas (1,3 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,04 log UFC/cm²). Para *Listeria* spp. la menor concentración fue a las 3 horas (1,74 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,08 log UFC/cm²). En la tabla 6 se muestran todos los valores obtenidos en el período de 3 a 192 horas de incubación.

Tabla 6: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 192 h de incubación sobre AI, de *P. aeruginosa* y *Listeria* spp aplicando la fórmula 1.

	Tiempo en horas								
	0	3	6	12	48	72	96	120	192
<i>Listeria</i> spp.	0,00	1,74	1,54	2,23	2,39	2,32	2,29	2,43	3,08
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	1,34	1,54	2,36	2,31	2,47	2,47	2,49	3,04

- PEAD

Los resultados de la concentración bacteriana en PEAD en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 2 (b). Donde *P. aeruginosa* mostró la menor concentración bacteriana a las 3 horas (1,74 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (2,99 log

UFC/cm²). Para *Listeria* spp. la menor concentración fue a las 3 horas (1,94 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,07 log UFC/cm²). En la tabla 7 se muestran todos los valores obtenidos en 192 horas de incubación.

Tabla 7: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 192 h de incubación sobre PEAD, de *P. aeruginosa* y *Listeria* spp aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas								
	0	3	6	12	48	72	96	120	192
<i>Listeria</i> spp.	0,00	1,94	2,04	2,60	2,68	2,67	2,69	2,86	3,07
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	1,74	2,00	2,63	2,75	2,83	2,82	2,94	2,99

- PTFE

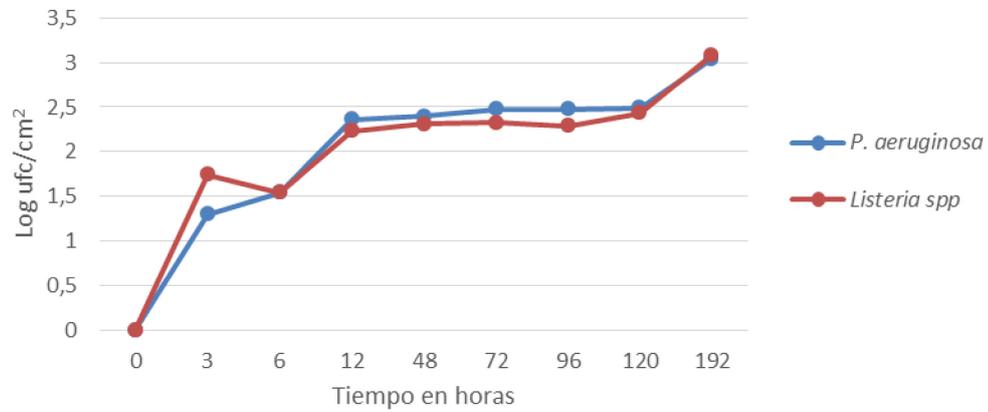
Los resultados de la concentración bacteriana en PTFE en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 2 (c). Donde *P. aeruginosa* mostró la menor concentración bacteriana a las 3 horas (1,64 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,04 log UFC/cm²). Para *Listeria* spp. la menor concentración fue a las 3 horas (1,89 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,08 log UFC/cm²). En la tabla 8 se muestran todos los valores obtenidos en 192 horas de incubación.

Tabla 8: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 192 h de incubación sobre PTFE, de *P. aeruginosa* y *Listeria* spp aplicando la fórmula 1.

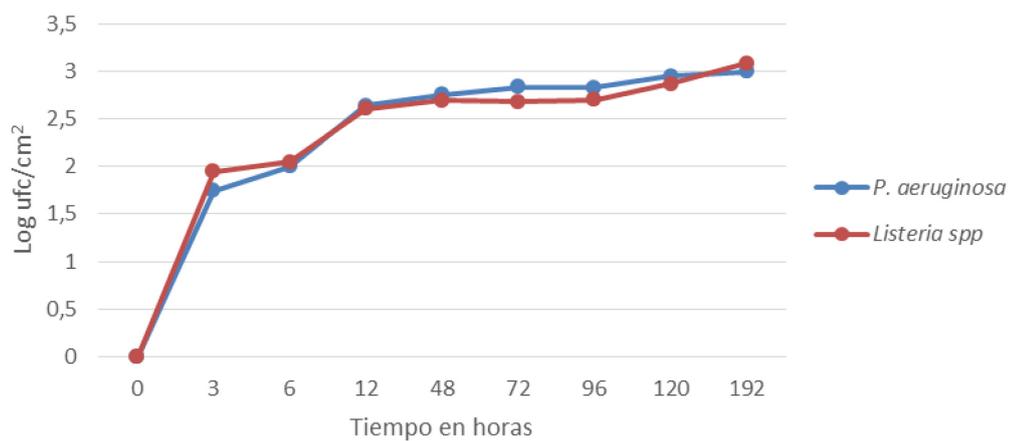
Cepa	Tiempo en horas								
	0	3	6	12	48	72	96	120	192
<i>Listeria</i> spp.	0,00	1,89	2,04	2,55	2,69	2,71	2,86	2,75	3,08
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	1,64	2,00	2,76	2,77	2,80	2,82	2,86	3,04

Gráfico 2: Valores obtenidos a partir de los recuentos de *P. aeruginosa* y *Listeria spp.* en AI (a), PEAD (b) y PTFE (c) a 3°C

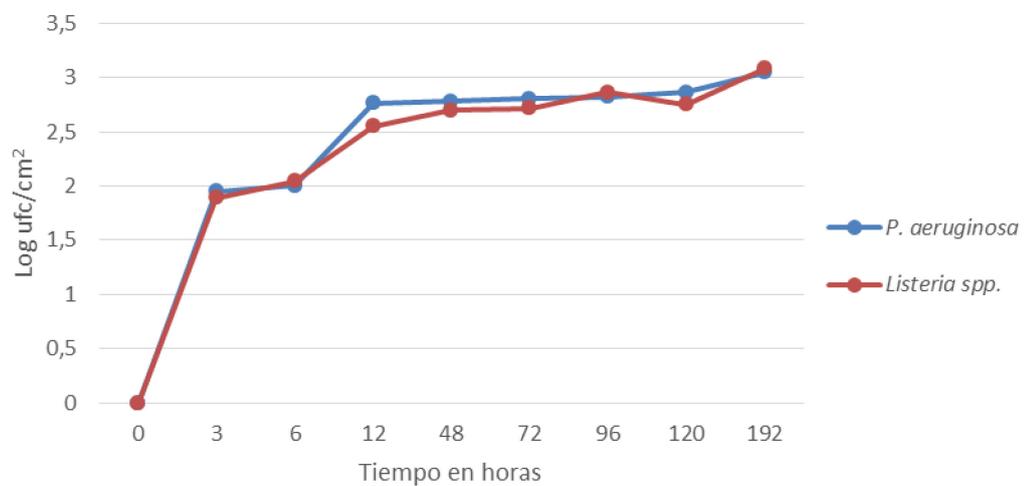
(a)



(b)



(c)



Los valores promedio de la concentración bacteriana de *Listeria* spp. y *P. aeruginosa* a 3°C durante 192 horas no mostraron diferencias significativas ($p>0,05$) en las superficies de Al, PEAD y PTFE (Tabla 9).

Tabla 9: Comparación de los valores promedios de concentración bacteriana (log UFC/cm²) de *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. a diferentes tiempos de lectura para las tres superficies estudiadas (Al, PEAD, PTFE) incubadas a 3°C.

Superficie	Cepa	Tiempo en horas							
		3	6	12	48	72	96	120	192
Al	<i>Listeria</i>	1,39	1,57	2,22	2,30	2,33	2,29	2,43	2,73
	spp.	±0,12	±0,05	±0,11	±0,17	±0,10	±0,08	±0,09	±0,10
	<i>P. aeruginosa</i>	1,24	1,50	2,36	2,39	2,47	2,48	2,47	2,69
		±0,34	±0,28	±0,08	±0,10	±0,06	±0,04	±0,21	±0,08
	P valor	0,61	0,77	0,29	0,56	0,22	0,09	0,82	0,69
PEAD	<i>Listeria</i>	1,59	1,69	2,25	2,34	2,33	2,35	2,52	2,73
	spp.	±0,16	±0,12	±0,07	±0,11	±0,10	±0,01	±0,04	±0,03
	<i>P. aeruginosa</i>	1,39	1,65	2,29	2,41	2,48	2,48	2,60	2,65
		±0,12	±0,07	±0,05	±0,04	±0,09	±0,04	±0,06	±0,03
	P valor	0,29	0,73	0,60	0,49	0,25	0,06	0,25	0,13
PTFE	<i>Listeria</i>	1,39	1,65	2,41	2,44	2,45	2,48	2,57	2,71
	spp.	±0,12	±0,07	±0,05	±0,03	±0,03	±0,04	±0,06	±0,05
	<i>P. aeruginosa</i>	1,54	1,74	2,20	2,35	2,37	2,46	2,41	2,73
		±0,09	±0,06	±0,12	±0,10	±0,04	±0,02	±0,01	±0,10
	P valor	0,29	0,29	0,13	0,33	0,14	0,71	0,05	0,84

Promedio ± desvío estándar. Medias con una letra en diferente son significativamente diferentes ($p<0,05$).

b. Incubación a 3°C de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp.

- AI

Los resultados de la concentración bacteriana en AI en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 3 (a). Donde *E. coli* mostró la menor concentración bacteriana las 12 horas (2,04 log UFC/cm²) y la mayor a las 96 y 240 horas de incubación (2,79 log UFC/cm²). La menor concentración para *Salmonella* spp se observó a las 24 horas (1,89 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 192 horas de incubación (2,27 log UFC/cm²). Para *E. coli* O157, la menor concentración fue a las 12 horas (1,64 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 192 horas (2,27 log UFC/cm²). En la tabla 10, se muestran los valores obtenidos en 240 horas de incubación.

Tabla 10: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 240 h de incubación sobre AI, de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas										
	0	3	6	12	24	48	72	96	144	192	240
<i>E. coli</i> .	0,00	0,00	0,00	2,04	2,58	2,75	2,71	2,79	2,75	2,70	2,79
<i>E. coli</i> O157	0,00	0,00	0,00	1,64	1,82	1,94	2,04	2,27	2,27	2,32	2,27
<i>Salmonella</i> spp	0,00	0,00	0,00	0,00	1,89	1,52	1,89	2,12	2,19	2,30	2,27

- PEAD

Los resultados de la concentración bacteriana en PEAD en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 3 (b). Donde *E. coli* mostró

la menor concentración bacteriana a las 12 horas (2,12 log UFC/cm²) y la mayor a las 72 horas (2,93 log UFC/cm²) decreciendo hasta las 240 horas de incubación (2,76 log UFC/cm²). Para *Salmonella* spp. la menor concentración fue a las 12 horas (1,34 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 144 horas (2,30 log UFC/cm²) decreciendo a las 240 horas de incubación (2,17 log UFC/cm²). Para *E. coli* O157, la menor concentración fue a las 12 horas (1,64 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas (2,17 log UFC/cm²). En la tabla 11 se muestran todos los valores obtenidos en 240 horas de incubación.

Tabla 11: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 240 h de incubación sobre PEAD, de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas										
	0	3	6	12	24	48	72	96	144	192	240
<i>E. coli</i> .	0,00	0,00	0,00	2,12	2,19	2,76	2,93	2,80	2,80	2,74	2,76
<i>E. coli</i> O157	0,00	0,00	0,00	1,64	1,89	2,04	2,22	2,27	2,45	2,76	2,34
<i>Salmonella</i> spp	0,00	0,00	0,00	1,34	1,82	1,94	2,15	2,12	2,24	2,30	2,17

- PTFE

Los resultados de la concentración bacteriana en AI en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 3 (c). Donde *E. coli* mostró la menor concentración bacteriana a las 12 horas (2 log UFC/cm²) y la mayor a las 72 horas (2,93 log UFC/cm²) decreciendo a las 240 horas de incubación (2,74 log UFC/cm²). Para *Salmonella* spp. la menor concentración fue a las 12 horas (1,89 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 192 horas (2,27 log UFC/cm²). Para *E. coli* O157 la menor concentración

fue a las 12 horas (1,64 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 192 horas de incubación (2,36 log UFC/cm²). En la tabla 12 se muestran todos los valores obtenidos en 240 horas de incubación.

Tabla 12: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 240 h de incubación sobre PTFE, de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas										
	0	3	6	12	24	48	72	96	144	192	240
<i>E. coli</i> .	0,00	0,00	0,00	2,00	2,23	2,76	2,93	2,80	2,87	2,77	2,74
<i>E. coli</i> O157	0,00	0,00	0,00	1,64	2,00	2,19	2,27	2,32	2,27	2,40	2,36
<i>Salmonella</i> spp	0,00	0,00	0,00	1,89	1,94	2,22	2,15	2,27	2,27	2,36	2,27

Las Tablas 13 y 14 muestran los valores de concentración bacteriana en log UFC/cm² obtenidos de la comparación de las cepas *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. a diferentes tiempos de lectura para las tres superficies estudiadas (Al, PEAD, PTFE).

La formación de biopelículas de *E. coli*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 a 3°C durante 240 horas (tabla 13), mostró diferencias significativas en los promedios de los recuentos para *E. coli* en las superficies de Al y PEAD a las 48, 72, 96, 144 y 240 horas de incubación ($p < 0,05$).

En el desarrollo de biopelículas de *E. coli*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 a 3°C durante 240 horas sobre PTFE (tabla 14), *E. coli* mostró diferencias significativas en los promedios de recuentos a las 48, 72, 96, 144, 192 y 240 horas de incubación ($p < 0,05$).

Tabla 13: Comparación del promedio de la concentración de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. (UFC/cm²) incubados a 3°C en AI y PEAD.

Sup.	Cepa	Tiempo en horas							
		12	24	48	72	96	144	192	240
AI	<i>E. coli</i>	1,60	2,24	2,41	2,37	2,45	2,41	2,36	2,44
		±0,00	±0,05a	±0,04a	±0,04a	±0,04a	±0,04a	±0,05	±0,07a
	<i>Salmonella</i> spp.	1,00	1,50	1,15	1,54	1,77	1,84	1,94	1,93
		±0,00	±0,28b	±0,21b	±0,09b	±0,10b	±0,09b	±0,14	±0,04b
	<i>E. coli</i> O157	1,24	1,45	1,59	1,69	1,93	1,92	1,96	1,91
		±0,34	±0,21b	±0,16b	±0,12b	±0,04b	±0,11b	±0,17	±0,19b
<i>P</i> valor		0,11	0,052	0,008	0,005	0,004	0,012	0,08	0,03
PE AD	<i>E. coli</i>	1,75	1,84	2,42	2,49	2,46	2,48	2,43	2,40
		±0,21	±0,09	±0,03a	±0,08a	±0,04a	±0,14a	±0,05a	±0,02a
	<i>Salmonella</i> spp.	1,00	1,50	1,15	1,54	1,77	1,84	1,94	1,93
		±0,00	±0,28b	±0,21b	±0,09b	±0,10b	±0,09b	±0,14	±0,04b
	<i>E. coli</i> O157	1,24	1,45	1,59	1,69	1,93	1,92	1,96	1,91
		±0,34	±0,21b	±0,16b	±0,12b	±0,04b	±0,11b	±0,17	±0,19b
<i>P</i> valor		0,11	0,052	0,008	0,005	0,004	0,012	0,08	0,03

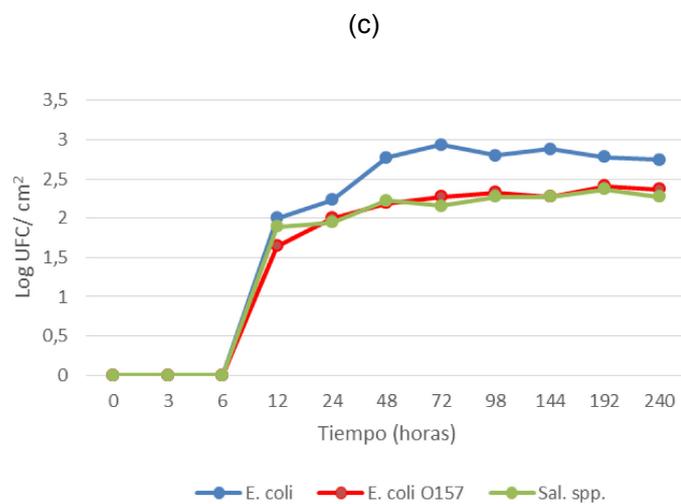
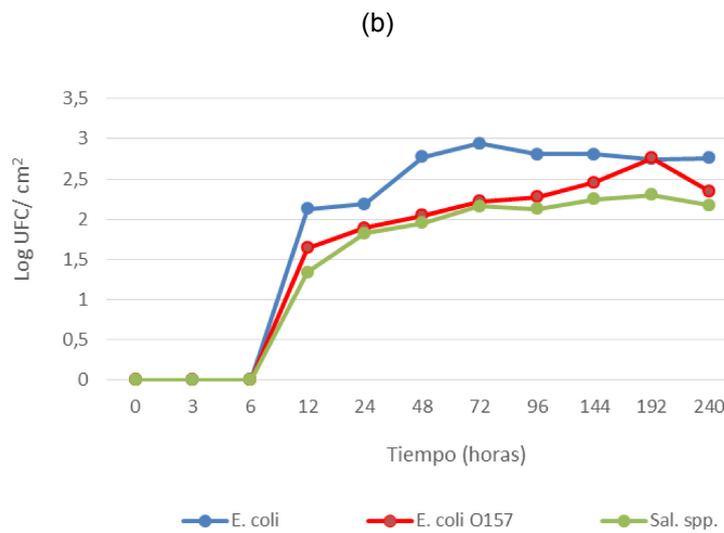
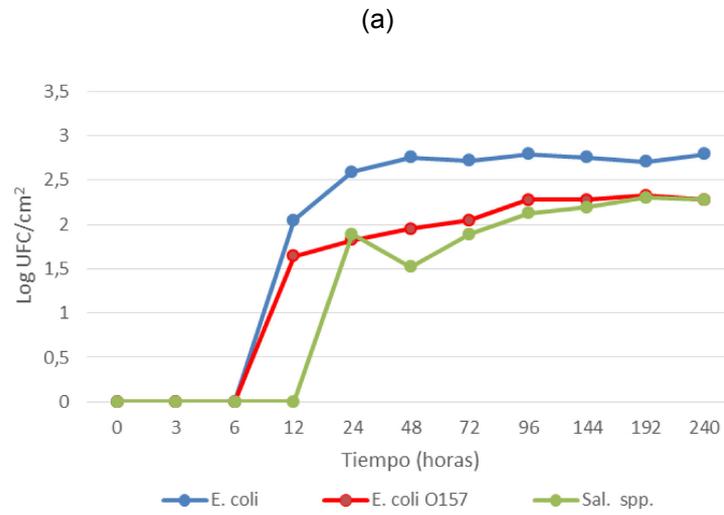
Promedio ± desvío estándar. Medias con una letra en diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Tabla 14: Resultados de la comparación de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. incubados a 3°C y en PTFE.

Sup.	Cepa	Tiempo en horas							
		12	24	48	72	96	144	192	240
PT FE	<i>E. coli</i>	1,63	1,87	2,41	2,46	2,45	2,44	2,43	2,40
		±0,21	±0,12	±0,13a	±0,04 ^a	±0,05 ^a	±0,09a	±0,05a	±0,02a
	<i>Sal.</i>	1,54	1,59	1,87	1,66	1,92	1,93	2,02	1,93
		±0,09	±0,16	±0,12b	±0,26b	±0,11b	±0,04b	±0,09b	±0,04b
	<i>E. coli</i> O157	1,24	1,57	1,83	1,92	1,98	1,97	2,06	2,01
		±0,34	±0,38	±0,18b	±0,11b	±0,03b	±0,10b	±0,03b	±0,15b
<i>P</i>		0,35	0,50	0,047	0,036	0,009	0,012	0,011	0,026

Promedio ± desvío estándar. Medias con una letra en diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Gráfico 3: Valores obtenidos a partir de los recuentos de *E. coli*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 en (a) Al, (b) PEAD y (c) PTFE a 3°C.



**c. Incubación a 10°C de *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*,
E. coli O157 y *Salmonella* spp.**

- AI

Los resultados de la concentración bacteriana en AI en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 4 (a). Donde los valores obtenidos a las 3 horas de incubación se encontraron dentro del mismo ciclo logarítmico (2,00 log UFC/cm²). *Salmonella* spp. y *E. coli* mostraron las concentraciones bacterianas más bajas (2,04 y 2,34 log UFC/cm² respectivamente) y en contraposición, *E. coli* O157 mostró la mayor concentración (2,93 log UFC/cm²). A las 96 horas *E. coli* O157 llegó a la mayor concentración (5,29 log UFC/cm²).

En la tabla 15 se muestran todos los valores obtenidos en 192 horas de incubación.

Tabla 15: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 192 h de incubación sobre AI, de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas								
	0	3	6	12	24	48	96	144	192
<i>E. coli</i> .	0,00	2,34	2,43	2,81	3,63	3,80	3,80	3,83	3,27
<i>E. coli</i> O157	0,00	2,93	3,03	3,45	4,10	4,74	5,29	4,70	4,57
<i>Salmonella</i> spp	0,00	2,04	2,19	2,44	3,06	3,89	4,10	3,68	3,43
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	2,46	2,89	3,15	4,46	4,04	5,18	5,24	5,23
<i>Listeria</i> spp.	0,00	2,92	2,94	3,20	4,05	4,29	5,41	5,13	5,05

- PEAD

Los resultados de la concentración bacteriana en PEAD en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 4 (b). Donde las concentraciones de *E. coli* y *E. coli* O157 (>3,26 log UFC/cm²) superaron los 3,00 log UFC/cm². Las mayores concentraciones bacterianas las alcanzaron *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. (6,20 y 6,02 log UFC/cm² respectivamente) a partir de las 48 horas.

Listeria spp. y *P. aeruginosa* superaron los 5,00 log UFC/cm² a partir de las 96 horas, al mismo tiempo, *E. coli* llegó a la mayor concentración (4,89 log UFC/cm²). En la tabla 16 se muestran todos los valores obtenidos en 192 horas de incubación.

Tabla 16: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 192 h de incubación sobre PEAD, de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas								
	0	3	6	12	24	48	96	144	192
<i>E. coli</i> .	0,00	3,26	4,02	4,23	4,48	4,79	4,89	4,77	4,16
<i>E. coli</i> O157	0,00	3,45	4,74	4,85	4,97	6,20	5,93	5,82	5,78
<i>Salmonella</i> spp	0,00	2,05	3,46	4,57	4,91	6,02	5,50	5,50	5,21
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	2,90	2,90	3,84	4,30	5,11	5,74	5,56	5,45
<i>Listeria</i> spp.	0,00	2,08	3,50	4,08	4,76	4,76	5,93	4,73	4,73

- PTFE

Los resultados de la concentración bacteriana en PTFE en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 4. Donde las concentraciones de *E. coli* y *E. coli* O157 superaron los 3,00 log UFC/cm² (>3,26 log UFC/cm²). Las mayores concentraciones bacterianas fueron

para *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. (6,25 y 6,06 log UFC/cm² respectivamente) a partir de las 48 horas. *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 superaron los 5,00 log UFC/cm² a partir de las 96 horas, al mismo tiempo, *E. coli* y *Listeria* spp. llegaron a la mayor concentración (4,92 y 4,95 log UFC/cm² respectivamente). En la tabla 17 se muestran todos los valores obtenidos en 192 horas de incubación.

Tabla 17: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 192 h de incubación sobre PTFE, de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas								
	0	3	6	12	24	48	96	144	192
<i>E. coli</i> .	0,00	3,26	3,74	4,23	4,23	4,86	5,00	4,92	4,57
<i>E. coli</i> O157	0,00	3,43	4,87	5,02	5,02	6,25	6,05	5,91	5,94
<i>Salmonella</i> spp	0,00	2,15	3,50	4,94	4,94	6,06	5,88	5,90	5,40
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	2,44	2,70	4,38	4,38	5,23	5,83	5,85	5,25
<i>Listeria</i> spp.	0,00	2,19	3,55	4,10	4,23	4,73	4,95	4,91	4,58

En la tabla 18 se muestra la comparación de los valores promedios de concentración bacteriana (log UFC/cm²) a diferentes tiempos de lectura para las tres superficies estudiadas incubadas a 10°C.

Gráfico 4: Valores obtenidos a partir de los recuentos de *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp., *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. en AI (a), PEAD (b) y PTFE (c) a 10°C.

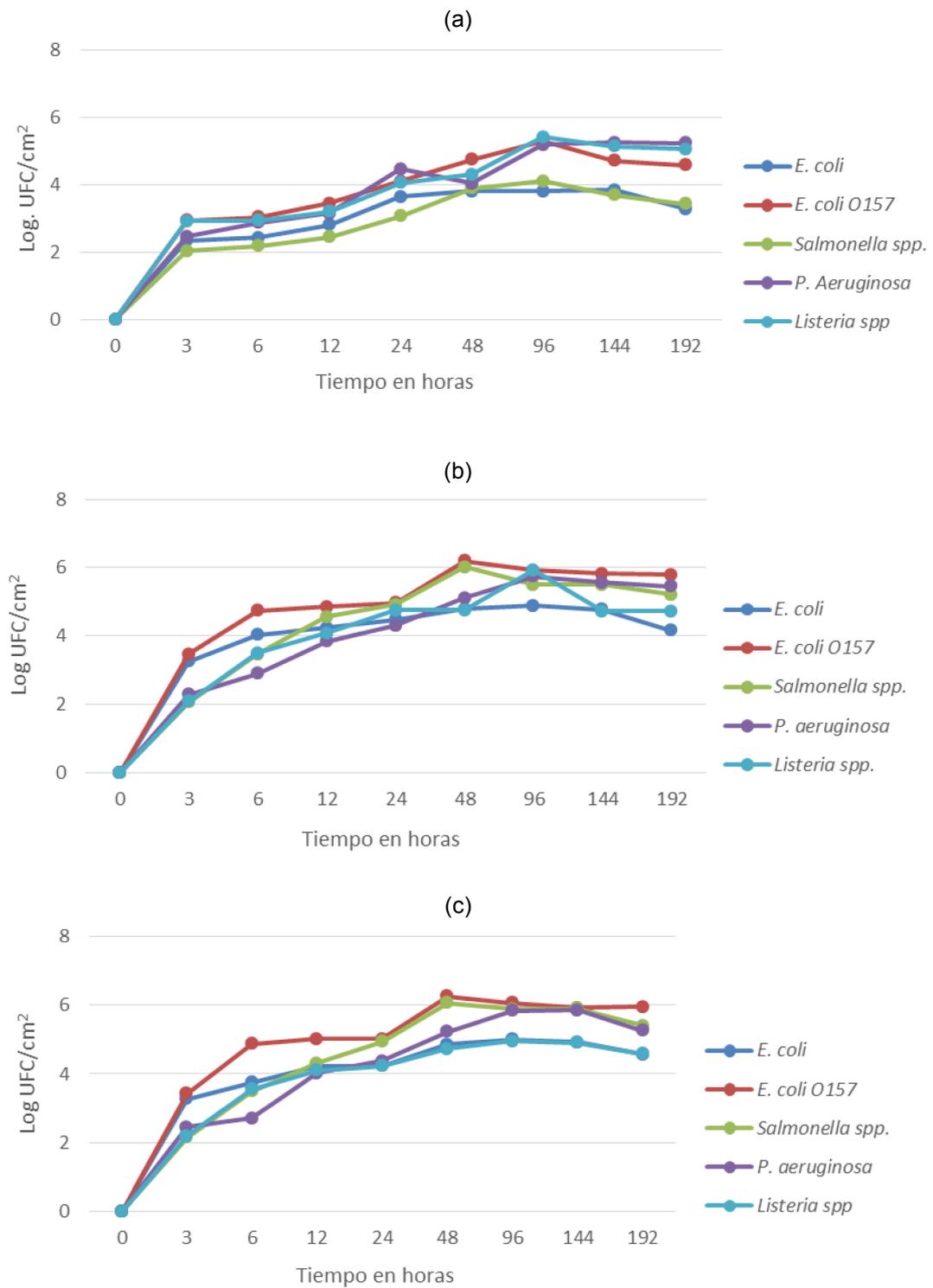


Tabla 18: Comparación de los valores promedios de concentración bact. (log UFC/cm²) a diferentes tiempos de lectura para las tres superficies estudiadas, incubadas a 10°C.

Sup	Cepa	Tiempo en horas							
		3	6	12	24	48	96	144	192
AI	<i>E. coli</i>	1,99	2,06	2,46	3,29	3,46	3,45	3,49	2,93
		±0,12c	±0,22b	±0,06c	±0,08c	±0,04d	±0,05d	±0,02c	±0,05e
	<i>E. coli</i> O157	3,11	4,39	4,51	4,63	5,86	5,58	5,48	5,44
		±0,0a	±0,06a	±0,01a	±0,02b	±0,01a	±0,04b	±0,02b	±0,02c
	<i>Salmo-</i> <i>nella</i> spp	2,58	2,43	2,85	3,70	3,95	5,07	4,79	4,71
		±0,05a	±0,05a	±0,03b	±0,03b	±0,03b	±0,02a	±0,05a	±0,02b
	<i>Listeria</i> spp.	1,66	1,84	2,10	2,88	3,54	3,76	3,34	3,09
	±0,26c	±0,09b	±0,03d	±0,02d	±0,04d	±0,06c	±0,03d	±0,05d	
	<i>P.Aerugi</i> <i>-nosa</i>	2,12	2,52	2,80	4,12	3,70	4,84	4,90	4,89
		±0,03b	±0,01a	±0,08b	±0,09a	±0,04a	±0,05b	±0,05a	±0,04a
	P valor	<0,001							
PE AD	<i>E. coli</i>	2,91	3,38	3,89	4,13	4,45	4,55	4,42	3,82
		±0,01b	±0,04b	±0,03b	±0,05b	±0,02d	±0,03d	±0,06c	±0,05a
	<i>E. coli</i> O157	3,09	4,53	4,17	4,68	4,91	5,71	5,61	5,60
		±0,06a	±0,04a	±0,65a	±0,01a	±0,01a	±0,04b	±0,05b	±0,05b
	<i>Salmo-</i> <i>nella</i> spp	1,74	3,15	3,74	3,94	4,42	4,58	5,42	4,38
		±0,03d	±0,04c	±0,04d	±0,03c	±0,02d	±0,07a	±0,03a	±0,09c
	<i>Listeria</i> spp.	1,71	3,11	4,22	4,57	5,67	5,49	5,15	4,87
	±0,08d	±0,07c	±0,03b	±0,03a	±0,07b	±0,06c	±0,09d	±0,06d	
	<i>P.Aerugi</i> <i>-nosa</i>	1,93	2,56	3,49	3,96	4,77	5,39	5,22	5,10
		±0,03c	±0,02d	±0,09e	±0,03c	±0,03c	±0,10b	±0,03a	±0,08e
	P valor	<0,001							
PT FE	<i>E. coli</i>	2,91	3,40	3,89	4,17	4,52	4,65	4,58	4,07
		±0,03b	±0,04b	±0,02b	±0,01b	±0,0d	±0,04c	±0,05c	±0,09a
	<i>E. coli</i> O157	3,09	4,53	4,17	4,68	4,91	5,71	5,61	5,60
		±0,06a	±0,04a	±0,65a	±0,01a	±0,01a	±0,04a	±0,05a	±0,05b
	<i>Salmo-</i> <i>nella</i> spp	1,71	3,15	3,96	4,59	5,72	5,54	5,56	5,07
		±0,08d	±0,08c	±0,03c	±0,12c	±0,01d	±0,06c	±0,05a	±0,07c
	<i>List.</i> spp.	1,84	3,21	3,76	3,89	4,39	4,61	4,57	4,08
	±0,12d	±0,03c	±0,02d	±0,01a	±0,06b	±0,03b	±0,03b	±0,05d	
	<i>P.aerugi</i> <i>-nosa</i>	2,10	2,36	3,67	4,03	4,88	5,49	5,21	4,91
		±0,05c	±0,01d	±0,05e	±0,04c	±0,01c	±0,06b	±0,03b	±0,05e
	P valor	<0,001							

Promedio ± desvío estándar. Medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,001$)

El desarrollo de biopelículas a 10°C presentó diferencias significativas ($p < 0,001$) en los promedios de los recuentos bacterianos, en todos los tiempos de lectura y en todas las superficies estudiadas.

d. *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. a 25°C.

- Al

Los resultados de la concentración bacteriana en Al en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 5. Donde la mayor concentración a las 3 horas fue de *E. coli* O157 (5,03 log UFC/cm²), seguido por *P. aeruginosa* (4,44 log UFC/cm²) y *E. coli* con 3,60 log UFC/cm².

La mayor concentración bacteriana fue de *E. coli* O157 (7,92 log UFC/cm²) a las 36 horas, seguido por *E. coli* (6,73 log UFC/cm²), *P. aeruginosa* (5,93 log UFC/cm²) y *Salmonella* spp. (5,91 log UFC/cm²). *Listeria* spp. alcanzó la mayor concentración a las 48 horas (7,00 log UFC/cm²). En la tabla 19 se muestran todos los valores obtenidos en 72 horas de incubación.

Tabla 19: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 72 h de incubación sobre Al, de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas								
	0	3	6	12	24	36	48	60	72
<i>E. coli</i> .	0,00	3,60	3,82	5,01	6,24	6,73	5,88	5,32	4,70
<i>E. coli</i> O157	0,00	5,03	6,20	6,20	6,73	7,92	6,87	5,86	4,56
<i>Salmonella</i> spp	0,00	2,80	2,82	4,40	4,99	5,91	5,89	4,93	3,78
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	4,44	4,53	4,92	4,93	5,93	5,27	4,72	3,90
<i>Listeria</i> spp.	0,00	2,80	3,31	3,31	3,52	5,07	7,00	5,24	3,93

- PEAD

Los resultados de la concentración bacteriana en AI en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 5. Donde la mayor concentración a las 3 horas fue de *P. aeruginosa* (5,04 log UFC/cm²) seguida por *E. coli* O157 (5 log UFC/cm²). La mayor concentración bacteriana fue alcanzada por *E. coli* O157 (7,77 log UFC/cm²) a las 48 horas, seguido por *E. coli* (7,63 log UFC/cm²). *P. aeruginosa*, *Listeria* spp y *Salmonella* spp. no superaron el valor de 6,81 log UFC/cm². En la tabla 20 se muestran todos los valores obtenidos en 72 horas de incubación.

Tabla 20: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 72 h de incubación sobre PEAD, de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas								
	0	3	6	12	24	36	48	60	72
<i>E. coli</i> .	0,00	4,96	5,16	5,76	6,01	6,62	7,63	7,24	6,85
<i>E. coli</i> O157	0,00	5,00	5,61	5,55	6,44	6,89	7,77	7,12	6,99
<i>Salmonella</i> spp	0,00	4,31	4,55	4,64	5,53	6,11	6,81	6,28	5,97
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	5,04	5,31	5,85	5,52	5,89	6,28	6,11	6,11
<i>Listeria</i> spp.	0,00	4,44	4,77	4,78	5,43	5,90	6,11	6,18	5,93

- PTFE

Los resultados de la concentración bacteriana en AI en función del tiempo de lectura se muestran en el gráfico 5. Donde la mayor concentración a las 3 horas fue de *E. coli* O157 (5,08 log UFC/cm²) seguida por *E. coli* (5,04 log UFC/cm²). Las mayores concentraciones bacterianas fueron alcanzadas a las 48 horas por *E. coli* O157 (7,79 log

UFC/cm²) y *E. coli* (7,48 log UFC/cm²). *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. no alcanzaron el valor de 6,00 log UFC/cm². *Listeria* spp. alcanzó la mayor concentración a las 48 horas (6,13 log UFC/cm²). En la Tabla 21 se muestran todos los valores obtenidos en 72 horas de incubación.

Tabla 21: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 72 h de incubación sobre PTFE, de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. aplicando la fórmula 1.

Cepa	Tiempo en horas								
	0	3	6	12	24	36	48	60	72
<i>E. coli</i> .	0,00	5,04	5,26	5,74	6,48	7,09	7,40	7,00	6,77
<i>E. coli</i> O157	0,00	5,08	5,55	5,08	6,60	7,17	7,79	7,45	6,80
<i>Salmonella</i> spp	0,00	4,44	4,92	4,19	5,53	5,55	5,55	5,36	4,74
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	4,97	5,29	5,26	5,45	5,70	5,70	5,58	5,87
<i>Listeria</i> spp.	0,00	4,43	4,76	5,19	5,55	5,63	6,13	6,03	5,94

Gráfico 5: Valores obtenidos a partir de los recuentos de *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp., *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. en AI (a), PEAD (2) y PTFE (c) a 25°C.

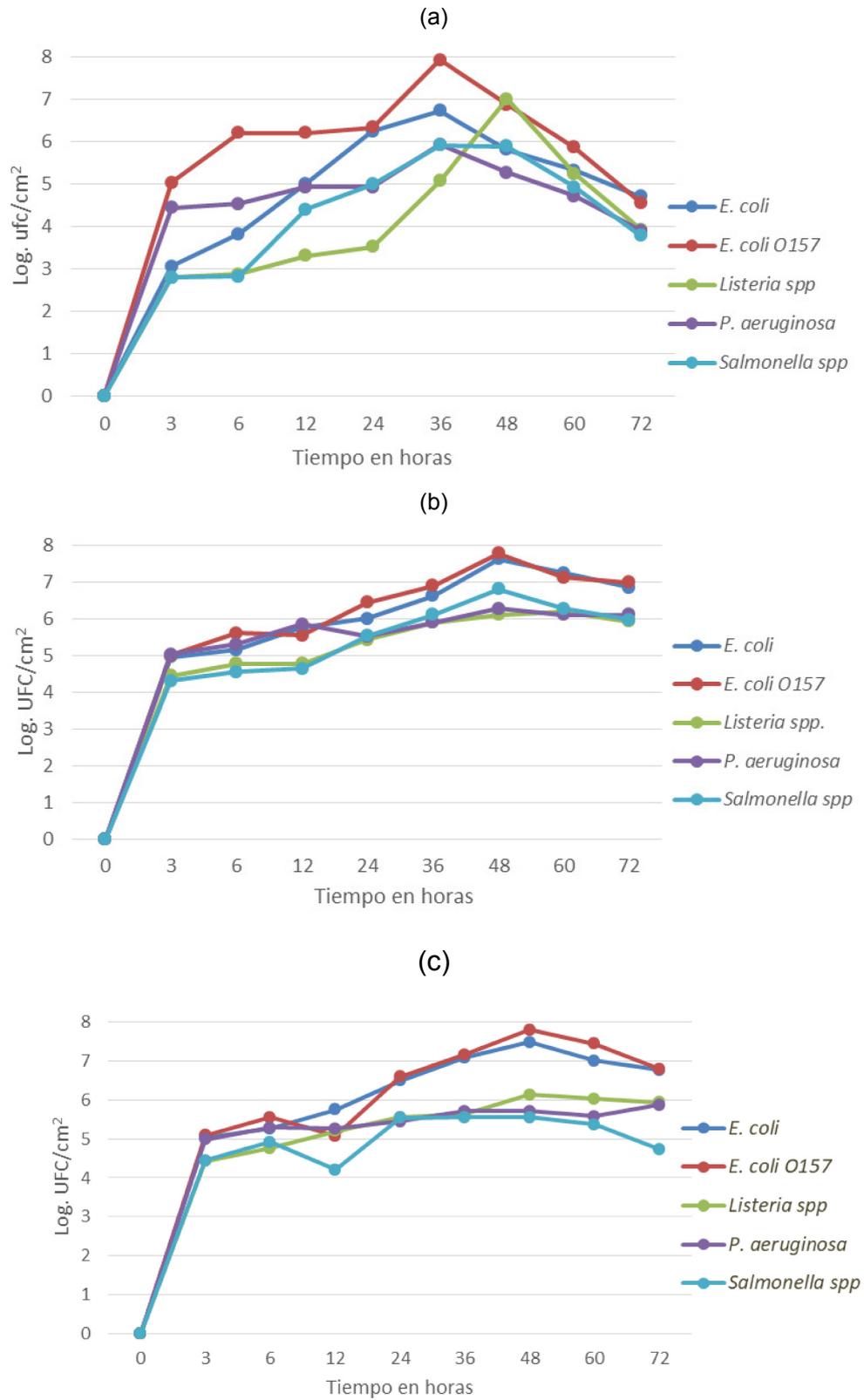


Tabla 22: Comparación de los valores promedios de concentración bacteriana (log UFC/cm²) a diferentes tiempos de lectura para las tres superficies estudiadas incubadas a 25°C.

Cepa	Tiempo en horas								
	3	6	12	24	36	48	60	72	
AI	<i>E. coli</i>	3,36	3,48	4,67	5,90	6,39	5,54	4,98	4,36
		±0,02a	±0,02a	±0,01a	±0,04a	±0,01a	±0,04a	±0,02a	±0,05a
	<i>E. coli</i> O157	2,46	2,57	4,06	4,65	5,56	5,54	4,59	3,35
		±0,01b	±0,02b	±0,03b	±0,03b	±0,02b	±0,05b	±0,05b	±0,10a
	<i>Salmo-</i> <i>nella</i> spp	5,08	5,12	5,86	6,39	7,57	6,52	5,52	4,21
		±0,02c	±0,0c	±0,0c	±0,01c	±0,04c	±0,05c	±0,04c	±0,09c
	<i>Listeria</i> spp.	2,55	2,62	2,97	3,18	4,73	6,65	4,90	3,58
		±0,05d	±0,04c	±0,01	±0,01d	±0,02d	±0,09d	±0,09d	±0,04b
	<i>P. aeru-</i> <i>ginosa</i>	4,10	4,19	4,57	4,59	5,59	4,92	4,37	3,56
		±0,03e	±0,02d	±0,02	±0,01e	±0,05e	±0,03e	±0,11c	±0,08b
P valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
P E A D	<i>E. coli</i>	4,62	4,81	5,42	6,07	6,67	7,29	6,90	6,51
		±0,02b	±0,05a	±0,06ab	±0,04a	±0,08a	±0,05a	±0,06a	±0,03a
	<i>E. coli</i> O157	4,66	5,27	5,11	6,10	6,94	7,42	6,77	6,64
		±0,03ab	±0,02b	±0,73ab	±0,05a	±0,02b	±0,03b	±0,08a	±0,01b
	<i>Salmo-</i> <i>nella</i> spp.	3,96	4,20	4,69	5,18	5,77	6,47	5,94	5,59
		±0,03d	±0,10c	±0,09a	±0,10b	±0,04c	±0,03c	±0,05b	±0,01c
	<i>Listeria</i> spp.	4,10	4,42	4,84	5,09	5,56	5,77	5,83	5,59
		±0,02c	±0,03d	±0,07ab	±0,06b	±0,03d	±0,07d	±0,04bc	±0,01c
	<i>P. aeru-</i> <i>ginosa</i>	4,70	4,97	5,89	5,17	5,54	5,96	5,76	5,59
		±0,02a	±0,03e	±0,05b	±0,10b	±0,00d	±0,04e	±0,11c	±0,01c
P valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
P T F E	<i>E. coli</i>	4,69	4,93	5,40	6,14	6,74	7,14	6,90	6,41
		±0,03a	±0,05a	±0,02a	±0,03a	±0,04a	±0,06a	±0,05a	±0,19a
	<i>E. coli</i> O157	4,74	5,21	5,74	6,26	6,87	7,46	7,10	6,45
		±0,03a	±0,03b	±0,02b	±0,02b	±0,05a	±0,05b	±0,04b	±0,05a
	<i>Salmo-</i> <i>nella</i> spp	4,09	4,27	4,84	5,19	5,32	5,20	5,01	4,33
		±0,09b	±0,08c	±0,13c	±0,04cd	±0,07b	±0,08c	±0,12c	±0,35b
	<i>Listeria</i> spp.	4,09	4,42	4,85	5,20	5,29	5,79	5,69	5,60
		±0,06b	±0,05d	±0,03c	±0,02c	±0,05b	±0,04d	±0,05d	±0,02a
	<i>P. aeru-</i> <i>ginosa</i>	4,62	4,95	4,92	5,10	5,31	5,36	5,24	5,62
		±0,06a	±0,01b	±0,03c	±0,06d	±0,07b	±0,05e	±0,04e	±0,63a
P valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Promedio ± desvío estándar. Medias con una letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,001$)

El desarrollo de biopelículas a 25°C presentó diferencias significativas ($p < 0,001$) en los promedios de los recuentos bacterianos, en todos los tiempos de lectura y en todas las superficies estudiadas.

ii. Aplicación de la ecuación de Gompertz a los datos experimentales.

A continuación se presenta el ajuste de los datos experimentales al modelo de Gompertz de *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp. *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. que formaron biopelículas en las superficies de Al, PEAD y PTFE, a las temperaturas de 3, 10 y 25°C. Para realizar el ajuste de los datos al modelo propuesto, se utilizaron los promedios de los recuentos obtenidos a diferentes tiempos de incubación.

La aplicación de este modelo se realizó con el fin de calcular los parámetros cinéticos μ (velocidad específica de crecimiento) y MPD (máxima densidad poblacional microbiana) en la formación de biopelículas a partir de las especies microbianas antes mencionadas en diferentes temperaturas y superficies.

a. Aplicación de la ecuación de Gompertz a *P. aeruginosa* y *Listeria* spp a 3°C, incubadas 192 horas.

Los resultados de los parámetros derivados μ y MPD resultaron muy similares en las tres superficies.

P. aeruginosa mostró los valores más altos de μ en Al y PTFE (0,17 Log [(UFC/cm²)/días]). Para MPD se observó el mismo valor en las

tres superficies (2,51 Log UFC/cm²). *Listeria* spp., mostró el mayor valor de μ en PTFE (0,11 Log [(UFC/cm²)/días] y en MPD el mayor valor fue de 2,53 Log UFC/cm²). En AI, *Listeria* spp. no se ajustó a la ecuación. Los valores de μ y MPD, se describen en tabla 23.

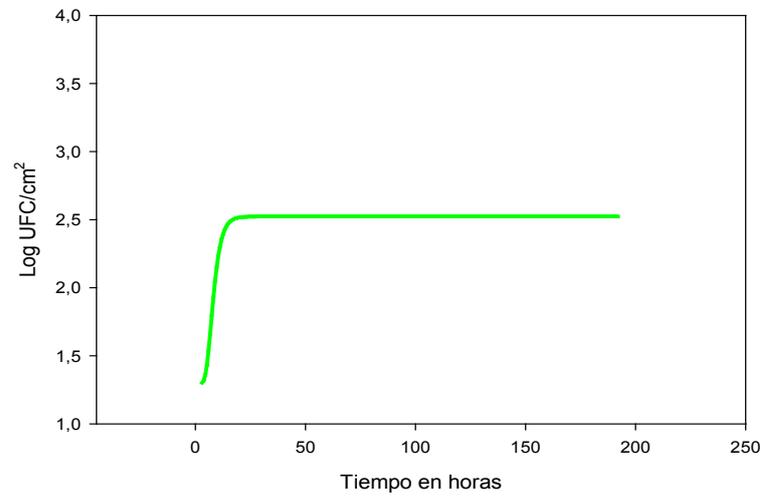
Tabla 23: Parámetros derivados de la ecuación de Gompertz obtenidos del promedio de los recuentos de *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. a 3°C y en AI, PEAD y PTFE.

T°	Cepa	Sup.	Parámetros Derivados	
			μ Log (UFC/cm ²)/d ⁻¹	MPD Log UFC/cm ²
3°C	<i>P. aeruginosa</i>	AI	0,17 ± 0,01	2,51 ± 2,32
		PEAD	0,13 ± 0,04	2,51 ± 0,90
		PTFE	0,17 ± 0,13	2,51 ± 1,31
	<i>Listeria</i> spp.	AI	-----	-----
		PEAD	0,10 ± 0,02	2,53 ± 1,80
		PTFE	0,11 ± 0,04	2,49 ± 1,04

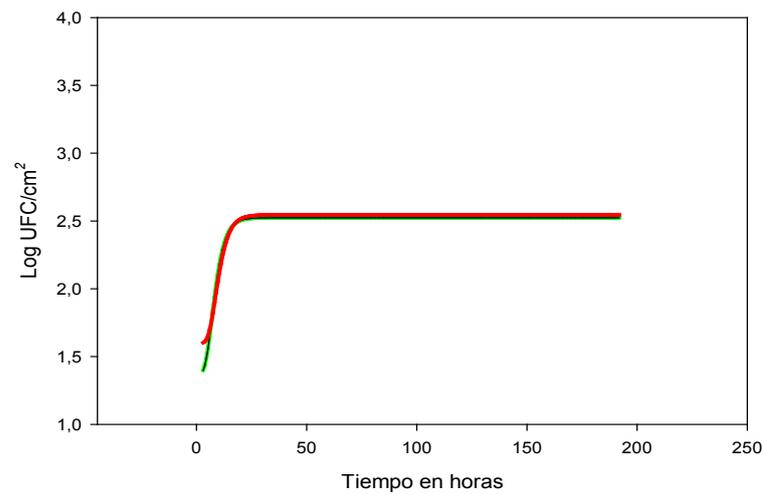
En el gráfico 6 se muestran las curvas obtenidas con la aplicación de la ecuación de Gompertz a los promedios de los recuentos en log UFC/cm² de las biopelículas de *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. en las tres superficies a 3°C.

Gráfico 6: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para *P. aeruginosa* en Al (a), *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. en PEAD (b) y *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. en PTFE (c) incubadas a 3°C.

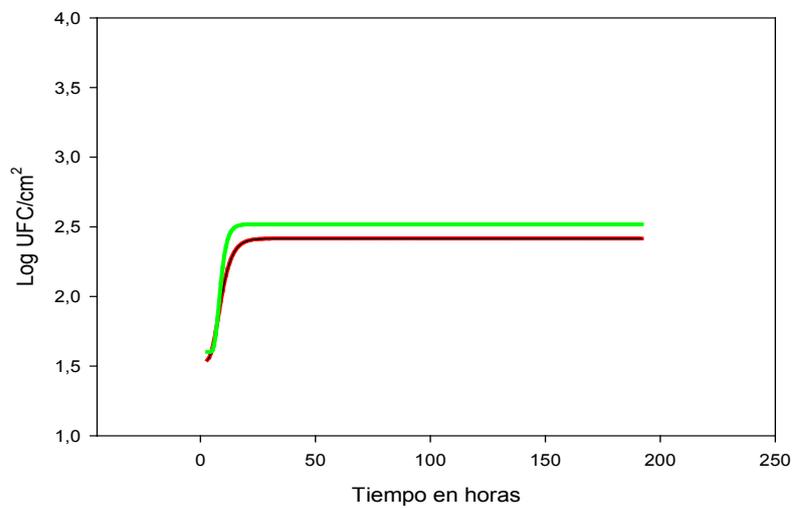
(a)



(b)



(c)



b. Aplicación de la ecuación de Gompertz a *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. a 3°C

Los valores más altos de μ y MPD en las tres superficies los mostró *E. coli* (en AI $\mu=0,04$ Log [(UFC/cm²)/días] y en PTFE MPD=2,42 Log [UFC/cm²]). Fue el único microorganismo que se obtuvieron valores de los parámetros derivados en las tres superficies. Los dos microorganismos restantes ajustaron en PTFE (*E. coli* O157) y PEAD (*Salmonella* spp.) (Tabla 24).

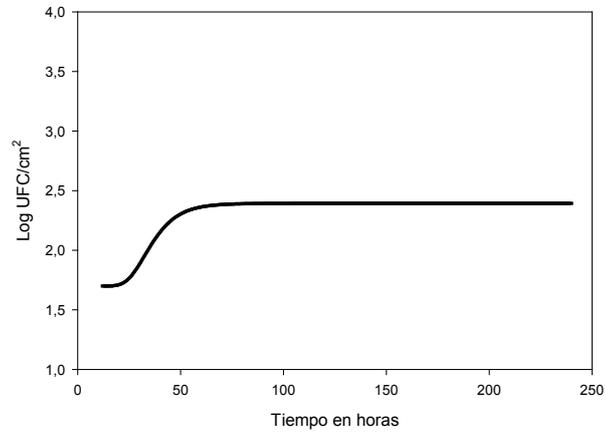
Tabla 24: Parámetros derivados de la ecuación de Gompertz obtenidos del promedio de los recuentos de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. a 3°C y en AI, PEAD y PTFE.

T°	Cepa	Sup.	Parámetros Derivados	
			μ Log (UFC/cm ²)/d ⁻¹	MPD Log UFC/cm ²
3°C	<i>E. coli</i>	AI	0,02 ± 0,01	2,36 ± 0,92
		PEAD	0,04 ± 0,02	2,37 ± 0,40
		PTFE	0,02 ± 0,01	2,42 ± 1,19
	<i>E. coli</i> O157	AI	----	----
		PEAD	----	----
		PTFE	0,02 ± 0,01	2,02 ± 0,60
	<i>Salmonella</i> spp.	AI	----	----
		PEAD	0,03 ± 0,01	1,82 ± 0,75
		PTFE	----	----

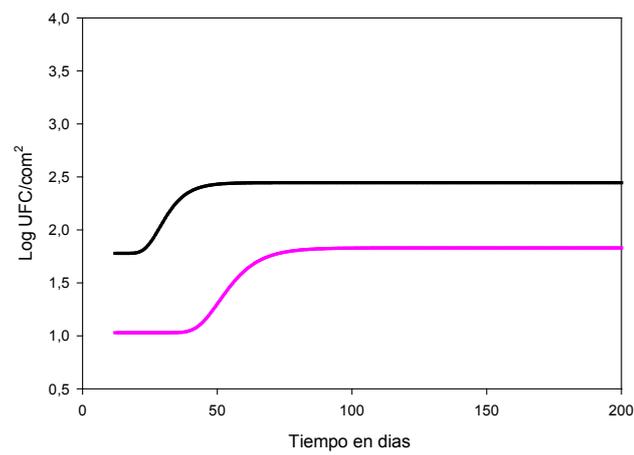
En el gráfico 7 se muestran las curvas obtenidas con la aplicación del modelo de Gompertz a los promedios de los recuentos expresados en log UFC/cm² de las biopelículas de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. en las tres superficies a 3°C.

Gráfico 7: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para *E. coli* en AI (a), *E. coli* y *Salmonella* spp en PEAD (b) y *E. coli*, *E. coli* O157 en PTFE (c) a 3°C.

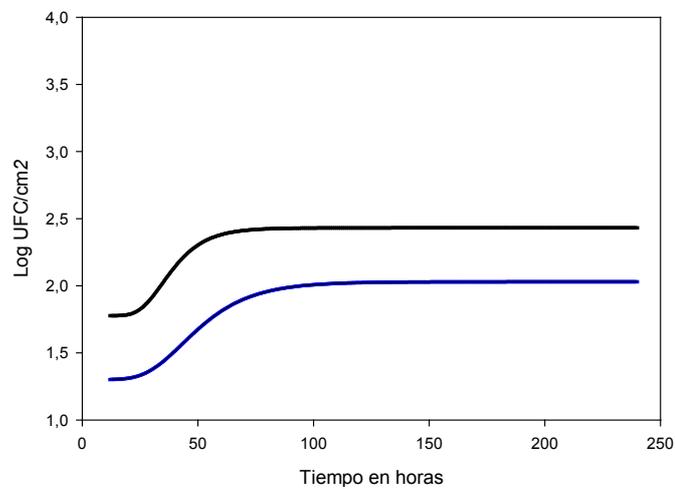
(a)



(b)



(c)



c. Aplicación de la ecuación de Gompertz a *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. a 10°C.

En PEAD se obtuvo el valor más alto de μ y fue para *E. coli* O157 (0,18 Log [(UFC/cm²)/días]), seguido por *E. coli* (0,17 Log [(UFC/cm²)/días] /días). Los máximos valores de MPD se encontraron también en la misma superficie (*E. coli* O157 con 5,49 Log UFC/cm², *E. coli* y *Salmonella* spp. con 5,27 Log UFC/cm²). En el caso de *P. aeruginosa* no ajustó al modelo en ninguna de las tres superficies (Tabla 25).

Tabla 25: Parámetros derivados de la ecuación de Gompertz obtenidos del promedio de los recuentos de *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. a 10°C y en AI, PEAD y PTFE.

T°	Cepa	Sup.	Parámetros Derivados	
			μ Log (UFC/cm ²)/d ⁻¹	MPD Log UFC/cm ²
10°C	<i>E. coli</i>	AI	0,08 ± 0,01	3,29 ± 2,07
		PEAD	0,17 ± 0,04	5,27 ± 2,84
		PTFE	0,10 ± 0,03	4,45 ± 1,46
	<i>E. coli</i> O157	AI	0,12 ± 0,03	4,41 ± 1,74
		PEAD	0,18 ± 0,02	5,49 ± 2,80
		PTFE	0,10 ± 0,03	4,45 ± 1,46
	<i>Listeria</i> spp.	AI	0,06 ± 0,02	5,13 ± 1,80
		PEAD	0,11 ± 0,02	4,35 ± 1,20
		PTFE	----	----
	<i>Salmonella</i> spp.	AI	0,11 ± 0,06	3,43 ± 1,84
		PEAD	0,17 ± 0,03	5,27 ± 1,23
		PTFE	0,15 ± 0,05	4,71 ± 1,10

En el gráfico 8 se muestran las curvas obtenidas con la aplicación del modelo de Gompertz a los promedios de los recuentos expresados en log UFC/cm² de las biopelículas de *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp en las tres superficies a 10°C.

d. Aplicación de la ecuación de Gompertz a *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. a 25°C.

Cuatro cepas ajustaron al modelo sobre AI (*E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp. y *Salmonella* spp.), el mayor valor de μ fue de 1,33 Log [(UFC/cm²)/días] para *E. coli* y en MPD fue el de *E. coli* O157 (4,41 Log UFC/cm²). En PEAD ajustaron al modelo *E. coli*, *E. coli* O157 y *P. aeruginosa*. Los valores más altos fueron: en μ , *P. aeruginosa* (1,23 Log [(UFC/cm²)/días]) y en MPD, *E. coli* O157 (6,96 Log UFC/cm²). En PTFE ajustaron *E. coli* y *E. coli* O157 donde la última mostró los valores más altos de μ (0,12 [(UFC/cm²)/días]) y MPD (7,02 Log UFC/cm²) (Tabla 26).

Gráfico 8: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. en Al (a) y PEAD (b) y *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. PTFE (c) a 10°C en Al.

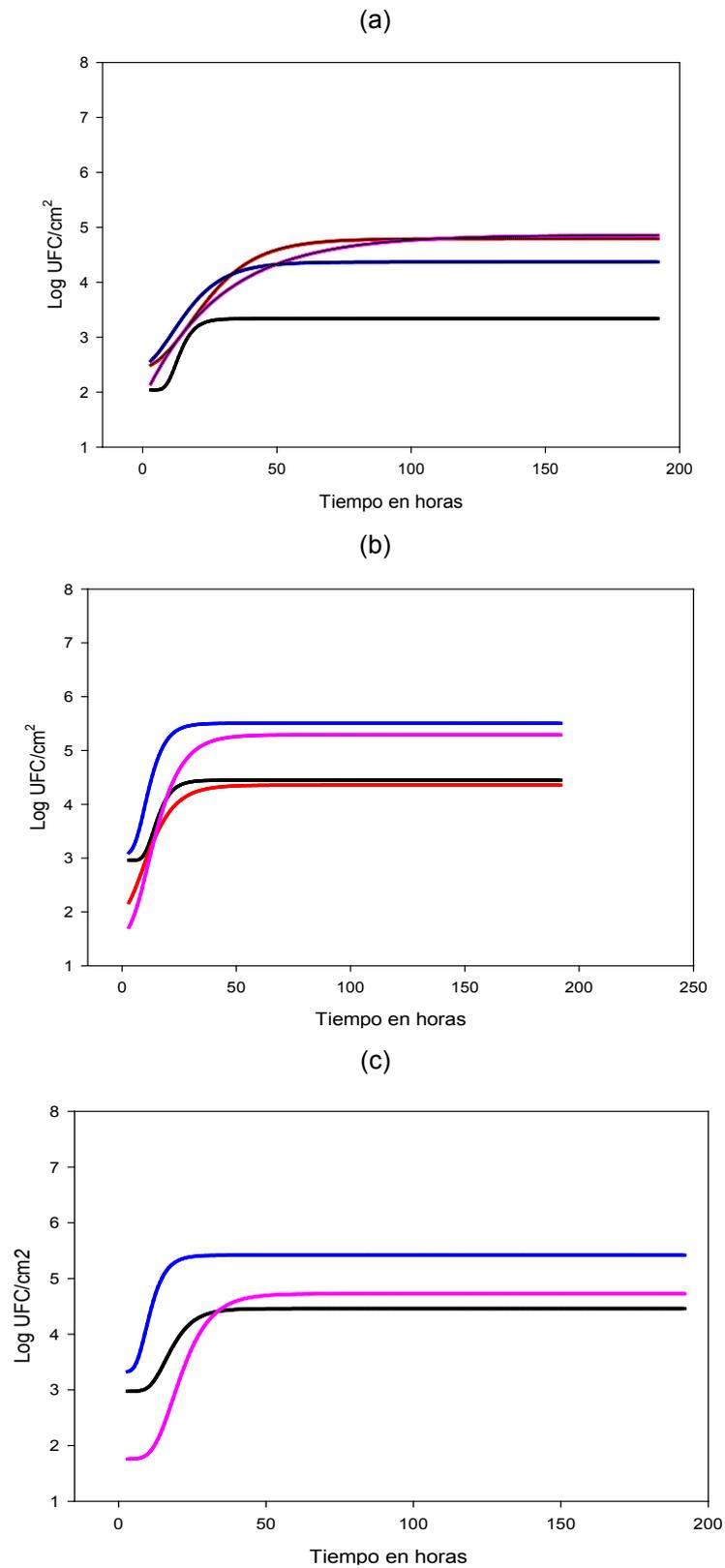


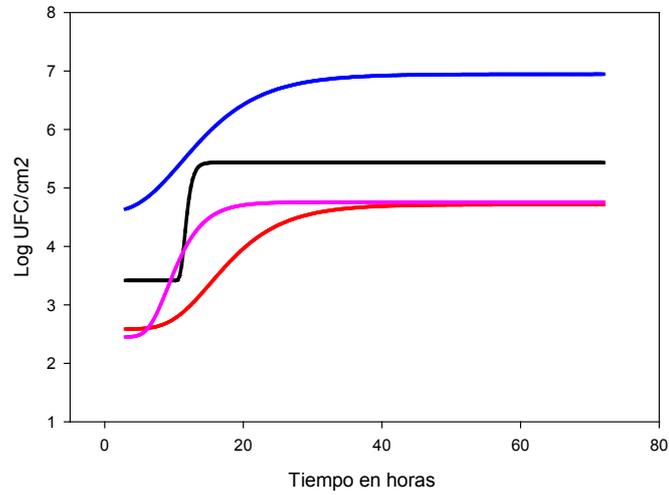
Tabla 26: Parámetros derivados de la ecuación de Gompertz obtenidos del promedio de los recuentos de *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. a 25°C.

T°	Cepa	Sup.	Parámetros Derivados	
			μ [Log (UFC/cm ²)/días]	MPD [Log UFC/ cm ²].
25°C	<i>E. coli</i>	AI	1,33 ± 0,59	5,71 ± 1,81
		PEAD	0,11 ± 0,09	5,71 ± 2,31
		PTFE	0,12 ± 0,03	7,02 ± 2,80
	<i>E. coli</i> O157	AI	0,11 ± 0,05	6,69 ± 1,60
		PEAD	---	---
		PTFE	---	---
	<i>Listeria</i> spp.	AI	0,22 ± 0,20	4,99 ± 1,71
		PEAD	---	---
		PTFE	---	---
	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	AI	1,23 ± 0,11	4,99 ± 2,78
		PEAD	---	---
		PTFE	---	---
	<i>Salmonella</i> spp.	AI	0,29 ± 0,10	4,75 ± 1,76
		PEAD	---	---
		PTFE	---	---

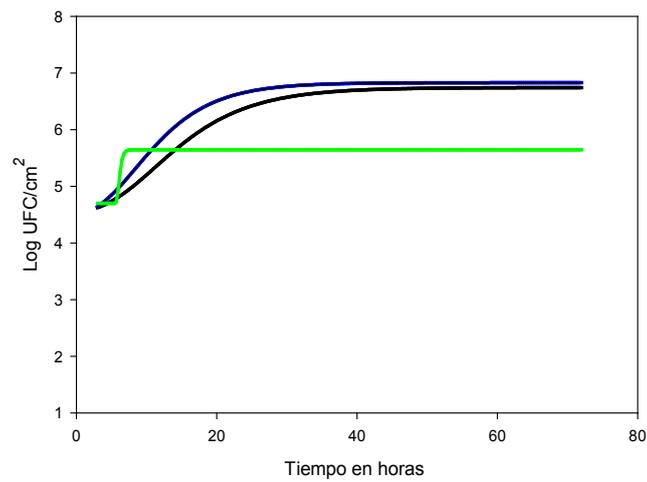
En el gráfico 9 se muestran las curvas obtenidas con la aplicación del modelo de Gompertz a los promedios de los recuentos expresados en log UFC/cm² de las biopelículas de *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp en las 3 superficies a 25°C.

Gráfico 9: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp. y *Salmonella* spp en AI (a), *E. coli*, *E. coli* O157 y *P. aeruginosa* en PEAD (b) y *E. coli* y *E. coli* O157 a 25°C.

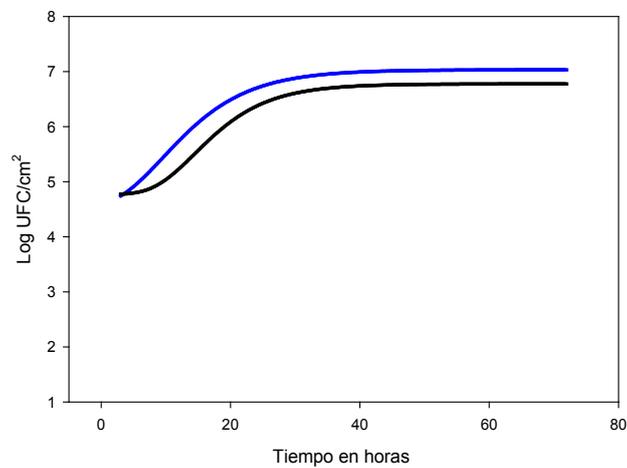
(a)



(b)



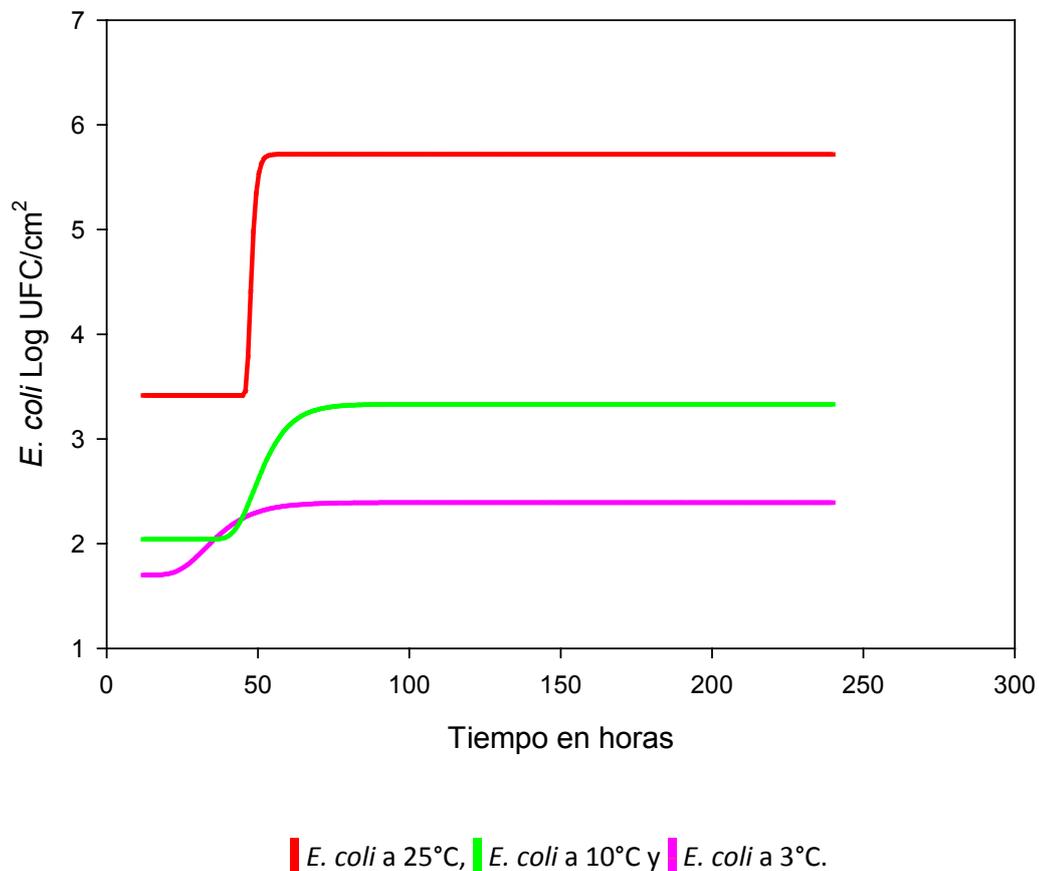
(c)



e. Aplicación de la ecuación de Gompertz al promedio de los recuentos de *E. coli* a tres temperaturas en AI.

Con el objetivo de mostrar como influyeron las diferentes temperaturas en las curvas de modelado se realizó una simulación empleando los datos experimentales de *E. coli* obtenidos en las tres temperaturas y en una misma superficie (AI). Se tuvo en cuenta que el tiempo utilizado en todos los estudios fue diferente, por lo que se decidió utilizar el tiempo más largo de incubación (240 horas). Se realizó el modelado y los resultados se muestran en el gráfico 10.

Gráfico 10: Aplicación de la ecuación de Gompertz a el promedio de los recuentos obtenidos para *E. coli* a tres temperaturas, en la misma superficie (AI) incubada durante 240 horas.



iii. Tinciones de superficies

A continuación se muestran las tres superficies representando cada categoría: a) sin coloración, b) tinción difusa y c) tinción total de la superficie, en Al (foto 18), PEAD (foto 19) y PTFE (foto 20).

Foto 18: Superficies de Al, a) sin coloración, b) tinción difusa y c) tinción total de la superficie.

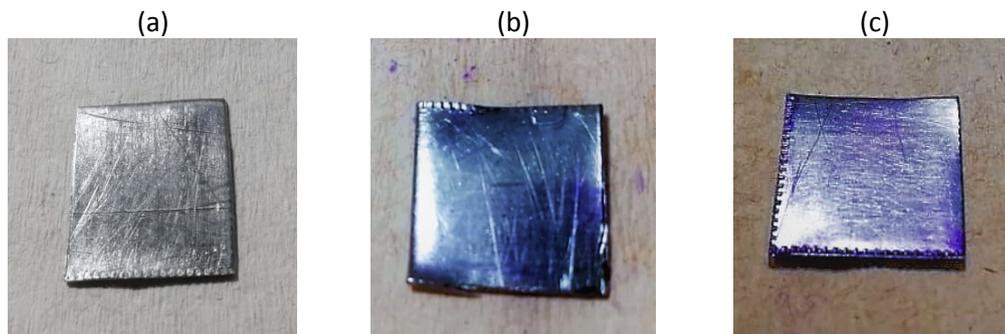


Foto 19: Superficies de PEAD, a) sin coloración, b) tinción difusa y c) tinción total de la superficie.

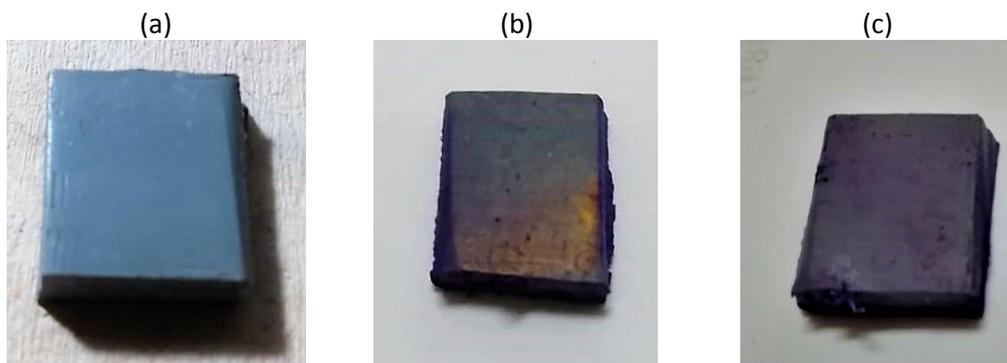
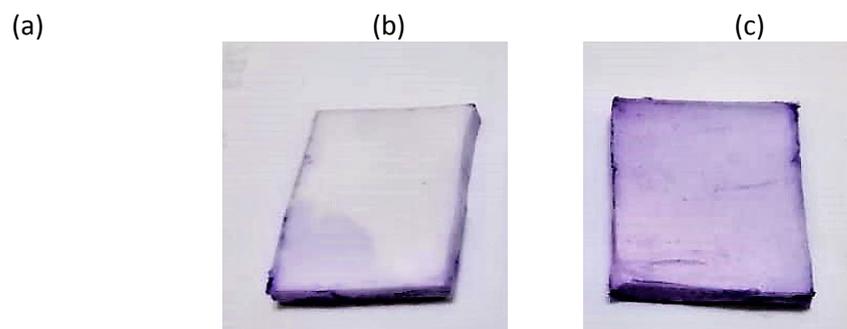


Foto 20: Superficies de PTFE, a) sin coloración, b) tinción difusa y c) tinción total de la superficie.



a. Tinción de superficies con *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. incubadas a 3°C.

En la Tabla 27, la categoría 1 (color celeste) se observó a las 3 horas de incubación en *Listeria* spp (1,89 log UFC/cm²). La coloración no fue completa en ninguna de las superficies, a pesar que se obtuvieron recuentos de 3,09 log UFC/cm² (*Listeria* spp. a las 192 horas).

Tabla 27: Resultado de la tinción de superficie a 3°C.

Temperatura	Cepas	Superficie	Tiempo en horas								
			0	3	6	12	48	72	96	120	192
3°C	<i>P. aeruginosa</i>	AI	0	0	0	1	1	1	1	1	1
		PEAD	0	0	1	1	1	1	1	1	1
		PTFE	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Listeria</i> spp	AI	0	0	0	1	1	1	1	1	1
		PEAD	0	1	1	1	1	1	1	1	1
		PTFE	0	1	1	1	1	1	1	1	1

Categoría 0= sin colorante (Blanco), categoría 1=Teñido difuso (Celeste)

El 80% de la superficie presenta teñido difuso (categoría 1), mientras que el 20% permanece sin coloración (categoría 0).

b. Tinción de superficies con *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. a 3°C.

En la tabla 28, la categoría 1 (color celeste) se observó a las 12 horas de incubación en *E. coli* (1,82 log UFC/cm²) en AI. *E. coli* O157 se observó la presencia de color a las 24 horas en PEAD y PTFE y a las 48 horas en AI. Para *Salmonella* spp. la tinción se observó a las 12 horas en PTFE y 24 horas en las restantes superficies.

Tabla 28: Resultado de la tinción de superficie a 3°C.

Temperatura	Cepas	Superficie	Tiempo en horas								
			0	12	24	48	72	96	144	192	240
3°C	<i>E. coli</i>	AI	0	1	1	1	1	1	1	1	1
		PEAD	0	1	1	1	1	1	1	1	1
		PTFE	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>E. coli</i> O157	AI	0	0	0	1	1	1	1	1	1
		PEAD	0	0	1	1	1	1	1	1	1
		PTFE	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Salmonella</i> spp	AI	0	0	1	1	1	1	1	1	1
		PEAD	0	0	1	0	1	1	1	1	1
		PTFE	0	1	1	1	1	1	1	1	1

Categoría 0= sin colorante (Blanco), categoría 1=Teñido difuso (Celeste)

El 82,4% de la superficie presenta teñido difuso, mientras que el 17,6% permanece sin coloración.

c. Tinción de superficies con *E. coli*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. a 10°C.

En la Tabla 29, la categoría 1 (color celeste) se observó a las 3 horas de incubación en las cinco cepas estudiadas. Donde el menor valor observado fue de 2,04 log UFC/cm² para *Salmonella* spp. La categoría 2 (color azul) se observó a partir de una concentración de 3,84 log UFC/cm².

d. Tinción de superficies con *E. coli*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. a 25°C.

En la tabla 30, la categoría 1 (color celeste) se observó a las 3 horas en las cinco cepas estudiadas. El menor valor obtenido fue de 2,80 log UFC/cm² (*Salmonella* spp. y *Listeria* spp.). La categoría 2 (color azul) se observó a partir de una concentración de 4,44 log UFC/cm².

Tabla 29: Resultado de la tinción de superficie a 10°C.

Temperatura	Cepas	Superficie	Tiempo en horas								
			0	3	6	12	24	48	96	144	192
10°C	<i>E. coli</i>	AI	0	1	1	1	1	2	2	2	2
		PEAD	0	1	1	1	1	2	2	2	2
		PTFE	0	1	1	1	1	2	2	2	2
	<i>E. coli</i> O157	AI	0	1	1	1	1	2	2	2	2
		PEAD	0	1	2	2	2	2	2	2	2
		PTFE	0	1	2	2	2	2	2	2	2
	<i>Salmonella</i> spp.	AI	0	1	1	1	1	2	2	2	2
		PEAD	0	1	1	2	2	2	2	2	2
		PTFE	0	1	1	2	2	2	2	2	2
	<i>Listeria</i> spp	AI	0	1	1	1	2	2	2	2	2
		PEAD	0	1	1	2	2	2	2	2	2
		PTFE	0	1	2	2	2	2	2	2	2
	<i>P. aeruginosa</i>	AI	0	1	1	1	2	2	2	2	2
		PEAD	0	1	1	1	2	2	2	2	2
		PTFE	0	1	1	2	2	2	2	2	2

Categoría 0= sin colorante (Blanco), categoría 1=Teñido difuso (Celeste), categoría 2=Teñido total (Azul).

El total de tinciones realizadas en este trabajo fue de 135. El 11,11% no presentó tinción (n=15), el 25,19% presentó tinción de categoría 1 (n=34) y el 63,70% (n=86) se ubicó en la categoría 2.

Tabla 30: Resultado de la tinción de superficie a 25°C.

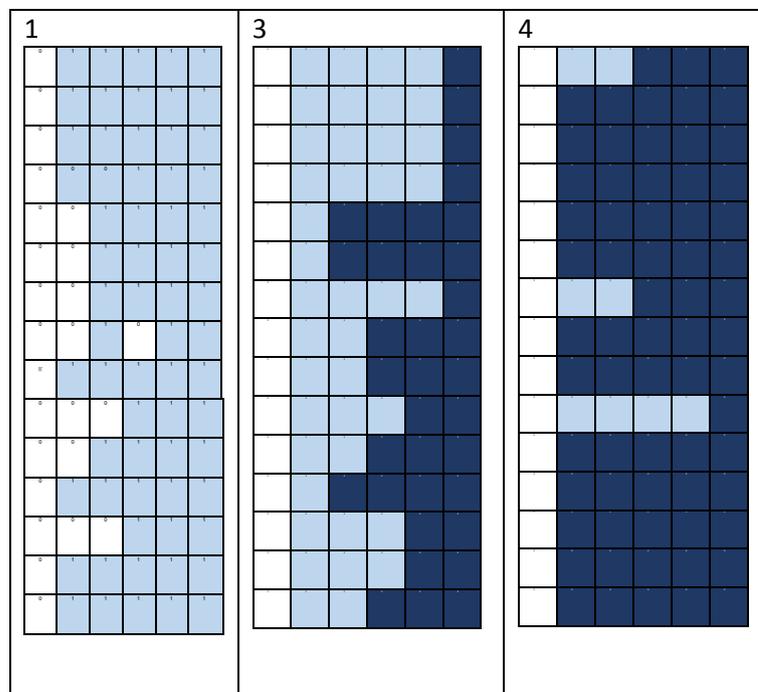
Temperatura	Cepas	Superficie	Tiempo en horas								
			0	3	6	12	24	36	48	60	72
25°C	<i>E. coli</i>	AI	0	1	1	2	2	2	2	2	2
		PEAD	0	2	2	2	2	2	2	2	2
		PTFE	0	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>E. coli</i> O157	AI	0	2	2	2	2	2	2	2	2
		PEAD	0	2	2	2	2	2	2	2	2
		PTFE	0	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>Salmonella</i> spp.	AI	0	1	1	1	2	2	2	2	2
		PEAD	0	2	2	2	2	2	2	2	2
		PTFE	0	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>Listeria</i> spp	AI	0	1	1	1	1	2	2	2	2
		PEAD	0	2	2	2	2	2	2	2	2
		PTFE	0	2	2	2	2	2	2	2	2
	<i>P. aeruginosa</i>	AI	0	2	2	2	2	2	2	2	2
		PEAD	0	2	2	2	2	2	2	2	2
		PTFE	0	2	2	2	2	2	2	2	2

Categoría 0= sin colorante (Blanco), categoría 1=Teñido difuso (Celeste), categoría 2=Teñido total (Azul).

El total de tinciones realizadas en este trabajo fue de 135. El 11,11% no presentó tinción (n=15), el 6,67% presentó tinción de categoría 1 (n=9) y el 82,22% (n=111) se ubicó en la categoría 2.

En la tabla 31 se muestra una vista general de las tablas 26, 27, 28 y 29. Se puede observar que el cambio de categoría (color) está relacionado con el crecimiento de la biopelículas en las superficies en las primeras 48 horas.

Tabla 31: Vista general de las 4 tablas con la lectura de superficie hasta las 48 horas. 1) *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. a 3°C y *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. a 3°C. 2) *E. coli*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. a 10°C. 3) *E. coli*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. a 25°C.



Categoría 0= sin colorante (Blanco), categoría 1=Teñido difuso (Celeste), categoría 2=Teñido total (Azul).

A continuación se presenta el resumen del porcentaje de categorías según la temperatura de incubación, para 3, 10 y 25°C en las primeras 48 horas (Tabla 32).

Tabla 32: Resumen del porcentaje de categorías según la temperatura de incubación.

Temperatura	Categoría (n;%)			p*
	0	1	2	
3°C	27 (17,00)	135 (83,00)	0 (0,00)	
10°C	15 (11,11)	34 (25,19)	86 (63,70)	>0,05
25°C	15 (11,11)	9 (6,67)	111 (82,22)	

*Prueba de Chi cuadrado

iv. **Aplicación de tres protocolos de Limpieza - Desinfección.**

a. **Protocolo 1** (detergente neutro y solución de hipoclorito de sodio 400 ppm). como desinfectante.

- Superficies incubadas a 3°C para *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. En la tabla 32 se expresan los resultados de los recuentos bacterianos (en UFC/0,1 ml) post aplicación del protocolo 1.

Tabla 33 : Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 1 en Al, PEAD y PTFE a 3°C.

Cepa	<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> O157		<i>Listeria</i> spp.		<i>P. aeruginosa</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Placa	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Al	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Te-flón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 33 se registró la presencia de una colonia bacteriana en la superficie de Al (color amarillo), en el ensayo de *E. coli* O157. El aislamiento obtenido, fue estudiado mediante pruebas bioquímicas y serológicas, obteniéndose resultados negativos a *Salmonella* spp, *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp y *P. aeruginosa*. Se aplicó la fórmula 1 utilizando

el número de colonias obtenidas (una colonia) en las diez placas sembradas, por la dilución cinco mililitros, dividido la suma de las cinco superficies hisopadas (11,25 cm²). El resultado obtenido fue de 4,44 UFC/cm². En las superficies de PEAD y PTFE no se observó desarrollo bacteriano.

- Superficies incubadas a 10°C para *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. En la tabla 33 se expresan los resultados de los recuentos bacterianos (en UFC/0,1 ml) post aplicación del protocolo 1.

Tabla 34: Resultados obtenidos en los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 1 en AI, PEAD y PTFE a 10°C.

Cepa	<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> O157		<i>Listeria</i> spp.		<i>P.aeruginosa</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Placa AI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Placa PEAD	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Placa Teflón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 34 se registró la presencia de una colonia bacteriana sobre la superficie de AI en el ensayo de *P. aeruginosa*. En PEAD se registró la presencia de una colonia en el ensayo de *E. coli* y una colonia en el ensayo de *P. aeruginosa*. Los aislamientos obtenidos, fueron

negativos a las cinco cepas estudiadas. Se aplicó la fórmula 1 y en la superficie que se aisló cada colonia, el valor fue de 4,44 UFC/cm². En la superficie de PTFE no se observó desarrollo bacteriano.

- Superficies incubadas a 25°C para *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. En la tabla 34 se expresan los resultados de los recuentos bacterianos (en UFC/0,1 ml) post aplicación del protocolo 1.

Tabla 35: Resultados obtenidos en los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 1 en AI, PEAD y PTFE a 25°C.

Cepa	<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> O157		<i>Listeria</i> spp.		<i>P.aeruginosa</i>		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Placa	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
	AI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0		0	0	0	0	0	0	0	1	0	
PEAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Te-flón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

En la tabla 35 se registró la presencia de una colonia en el ensayo de *E. coli* y una colonia en el ensayo de *P. aeruginosa* en la superficie de AI. En PEAD se observaron los mismos resultados que en AI pero en diferentes ensayos (*E. coli* O157 y *Listeria* spp). En PTFE se registró 1 colonia en el ensayo de *E. coli*. Los aislamientos obtenidos fueron negativos a las cinco

cepas estudiadas. Se aplicó la Fórmula 1 y en cada una de las superficies que se aislaron microorganismos el valor fue de 4,44 UFC/cm².

b. Protocolo 2 (catolito 50% y agua electroactivada al 100%).

- Superficies incubadas a 3°C para *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. En la tabla 35 se expresan los resultados de los recuentos bacterianos (en UFC/0,1 ml) post aplicación del protocolo 2.

Tabla 36: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 2 en Al, PEAD y PTFE a 3°C.

Cepa	<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> O157		<i>Listeria</i> spp.		<i>P.aeruginosa</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Al	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Te-flón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 36 se registró la presencia de una colonia en la superficie de PEAD en el ensayo de *E. coli*. Para Al y PTFE, no se observó desarrollo bacteriano. El aislamiento obtenido fue negativo a las cinco cepas estudiadas. Se aplicó la Fórmula 1 y en la superficie que se aisló el microorganismo el valor fue de 4,44 UFC/cm².

- Superficies incubadas a 10°C para *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. En la tabla 36 se expresan los resultados de los análisis microbiológicos (UFC/0,1 ml) post aplicación del protocolo 2.

Tabla 37: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 2 en AI, PEAD y PTFE a 10°C.

Cepa	<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> O157		<i>Listeria</i> spp.		<i>P.aeruginosa</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
AI	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
PEAD	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Te- flón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 37 se registró la presencia de una colonia en el ensayo de *E. coli* y 1 en el ensayo de *Listeria* spp. sobre la superficie de AI. En PEAD se registró una colonia en el ensayo de *E. coli* y otra en el de *P. aeruginosa*. Lo mismo sucedió en PTFE, donde las presencias fueron en los ensayos de *Salmonella* spp. y *E. coli*. Los aislamientos obtenidos fueron negativos a las 5 cepas estudiadas. Se aplicó la Fórmula 1 y en la superficie que se aisló el microorganismo el valor fue de 4,44 UFC/cm².

- Superficies incubadas a 25°C para *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E.coli*, *E.coli* O157 y *Salmonella* spp. En la tabla 37 se expresan los

resultados de los análisis microbiológicos (UFC/0,1 ml) post aplicación del protocolo 2.

Tabla 38: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 2, en AI, PEAD y PTFE a 25 °C.

Cepa	<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> O157		<i>Listeria</i> spp.		<i>P.aeruginosa</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Placa	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Te-flón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 38 no se registró desarrollo bacteriano en AI. En PEAD se observó una colonia en el ensayo de *Salmonella* spp. y una colonia en el de *Listeria* spp. En PTFE, se observó una colonia en el ensayo de *Salmonella* spp. y una en el de *E. coli* O157. Los aislamientos obtenidos, fueron negativos a las cinco cepas estudiadas. Se aplicó la Fórmula 1 y en la superficie que se aisló el microorganismo el valor fue de 4,44 UFC/cm².

c. Protocolo 3 (detergente alcalino y la solución de ácido acético 2000 ppm).

- Superficies incubadas a 3°C para *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. En la tabla 38 se expresan los resultados de los análisis microbiológicos (UFC/0,1 ml) post aplicación del protocolo 3.

Tabla 39: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 3 en AI, PEAD y PTFE a 3°C.

Cepa	<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> O157		<i>Listeria</i> spp.		<i>P.aeruginosa</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Placa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Te-flón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 39 no se registró desarrollo bacteriano.

- Superficies incubadas a 10°C para *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. En la tabla 39 se expresan los resultados de los análisis microbiológicos (UFC/0,1 ml) post aplicación del protocolo 3.

Tabla 40: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 3, de AI, PEAD y PTFE a 10°C.

Cepa	<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> O157		<i>Listeria</i> spp.		<i>P.aeruginosa</i>	
Placa	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
AI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Te-flón	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 40 no se observó desarrollo bacteriano en la superficie de AI. Para PEAD la presencia una colonia se observó en el ensayo de *E. coli*. En PTFE la presencia de una colonia observó en el ensayo de *E. coli* O157. Los aislamientos, fueron negativos a las cinco cepas estudiadas. Se aplicó la Fórmula 1 y en la superficie que se aisló el microorganismo el valor fue de 4,44 UFC/cm².

- Superficies incubadas a 25°C para *P. aeruginosa*, *Listeria* spp, *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. En la tabla 40 se expresan los resultados de los análisis microbiológicos (UFC/0,1 ml) post aplicación del protocolo 3.

Tabla 41: Resultados obtenidos de los recuentos bacterianos post aplicación del protocolo 3 en AI, PEAD y PTFE a 25°C.

Cepa	<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> O157		<i>Listeria</i> spp.		<i>P.aeruginosa</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Placa	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
AI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Te- flón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 41 se registró la presencia de una colonia en el ensayo de *Listeria* spp. En PEAD no se observó desarrollo bacteriano. En PTFE la presencia de una colonia se observó en el ensayo de *E. coli*. Los aislamientos, fueron negativos a las cinco cepas estudiadas. Se aplicó la Fórmula 1 y en la superficie que se aisló el microorganismo el valor fue de 4,44 UFC/cm².

Resultados obtenidos de las tinciones de superficies: Los resultados de las 135 tinciones fueron negativos.

Discusión

i. Desarrollo de biopelículas

En este trabajo todas las cepas (*E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp.) produjeron biopelículas en las diferentes superficies (Al, PEAD y PTFE) y en las 3 temperaturas experimentadas (3, 10 y 25°C).

A 3°C de temperatura, las cepas de *Listeria* spp. y *P. aeruginosa* se adhirieron a las 3 superficies a las 3 horas de incubación y formaron biopelículas cuya mayor concentración fue de 2,99 y 3,08 log UFC/cm² a las 192 horas (8 días). Este resultado indicaría que muchas de las cepas aisladas de las superficies que están en contacto con los alimentos y en alimentos pueden producir biopelículas. Para que esto se cumpla las superficies deben ofrecer las condiciones extrínsecas necesarias. Villanueva y col. (2017), trabajaron sobre 14 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de queso y comprobaron que el 64,5% produjeron biopelículas. Di Bonaventura y col. (2008), obtuvieron biopelículas de 44 cepas de *Listeria monocytogenes* a 4°C en Al, plástico y vidrio, obteniendo una diferencia significativa en el vidrio. Moltz y col. (2005), informaron una concentración de 10⁵ UFC/6,45 cm² en Al a 4°C durante 4 días. Los valores promedio de la concentración bacteriana de *Listeria* spp. y *P. aeruginosa* a 3°C durante 192 horas, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las superficies de Al, PEAD y PTFE

Con la aplicación de la ecuación de Gompertz a *Listeria* spp y *P. aeruginosa* se observó que *P. aeruginosa* se ajustó al modelo empleado

en las tres superficies, produciendo el mayor valor de μ . En las superficies de PEAD y PTFE se obtuvieron resultados muy similares, observándose la diferencia más importante en la superficie de Al, ya que *Listeria* spp. no se ajustó a la ecuación utilizada. El porcentaje de cepas que se ajustaron a la ecuación fue del 86,60%. Estos resultados se justificarían debido a que *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. son microorganismos que resisten cambios extremos en el medio ambiente, ya sea biótico o abiótico, y están dotados con la capacidad de producir biopelículas (Copes y col., 2000; Chavant y col., 2002; Xinzhe Gu, 2016). *Pseudomonas* es una especie bacteriana que en condiciones aeróbicas y en bajas temperaturas produce un marcado deterioro en los alimentos (Gill y col., 2000, Copes y col., 2005), también se encuentra asociada con *Listeria* spp. formando biopelículas mixtas a bajas temperaturas (Hernandez Puga C, 2016).

En los experimentos realizados con cepas de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. en las mismas superficies y a 3°C, se comprobó la adherencia a las 12 horas en los dos primeros casos (*E. coli*, *E. coli* O157) y a las 24 horas en el tercero (*Salmonella* spp). A las 240 horas (10 días) de incubación, la mayor concentración bacteriana fue de *E. coli* (2,79 UFC/cm²). El comportamiento de las bacterias coliformes evaluadas en este estudio fue muy similar a los datos consultados en la bibliografía. Varios autores realizaron distintos ensayos para producir biopelículas a bajas temperaturas y en diferentes matrices. En Al, Dantas Espadas y col., (2014), desarrollaron biopelículas de *E. coli* O157 en 144 horas incubando a 6°C, y obtuvieron una concentración bacteriana de 3

log UFC/cm². Dourou y col. (2011), utilizaron cupones de Al y de PEAD, inoculados con *E. coli* O157 en carne molida unos y otros con un homogeneizado de carne más caldo tripticasa soya y fueron incubados a 4°C. El resultado que obtuvieron fue de 2,5 log UFC/cm² (con la carne molida) y 2 log UFC/cm² (con el homogeneizado) a las 168 horas (7 días) de incubación.

En referencia a *Salmonella* spp., una gran cantidad de cepas tienen la capacidad de producir biopelículas en diferentes superficies y a bajas temperaturas (Silva y col., 2008; Lianou y col., 2012; Paz-Méndez y col., 2017). Recientemente Borges y col. (2018), estudiaron la capacidad de producir biopelículas a partir 243 cepas de *Salmonella entérica*, de las cuales 96 cepas (39,5%) produjeron biopelículas a 3°C.

La formación de biopelículas de *E. coli*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 a 3°C durante 240 horas, mostró diferencias significativas en los promedios de los recuentos para *E. coli* en las superficies de Al y PEAD a las 48, 72, 96, 144 y 240 horas de incubación ($p < 0,05$). Sobre PTFE, *E. coli* mostró diferencias significativas en los promedios de recuentos a las 48, 72, 96, 144, 192 y 240 horas de incubación ($p < 0,05$).

Con la aplicación de la ecuación de Gompertz, se observó que solamente *E. coli* logró un ajuste en las tres superficies, obteniendo el mayor valor de μ . Esto podría estar relacionado al medio ambiente donde se encuentra la matriz (PEAD) de donde se aisló esta cepa. El protocolo de uso de los contenedores de PEAD en el establecimiento del Comedor Universitario, indica que gran parte del día se encuentran en la cámara

fría ($3^{\circ}\text{C} \pm 3$). Estos cambios de temperatura en forma constante podrían haber influido para que *E. coli* desarrollara la habilidad mostrada para crecer a 3°C .

Las otras cepas que se ajustaron a Gompertz fueron *Salmonella* spp. en PEAD y *E. coli* O157 en PTFE. El porcentaje final de cepas que ajustaron a la ecuación fue del 44,44%. Todas las cepas incubadas a 3°C mostraron valores de MPD muy similares, con excepción de *Listeria* spp. que produjo el mayor valor (2,53 Log UFC/cm²). Un hecho de relevancia que se observó en *Listeria* spp. fue que en todo el tiempo en que se realizó el experimento (192 y 240 horas) las cepas no mostraron una tendencia a disminuir su crecimiento, sino por el contrario, en algunos casos se elevó levemente. Este resultado nos creó algunas incógnitas y generó nuevas ideas para futuros estudios. El comportamiento exhibido por *Listeria* spp. a bajas temperaturas y en superficies inertes, fue considerado de relevancia debido a que los alimentos conservados en esos ambientes no están libres de sufrir contaminación.

Silva y col. (2008), resaltaron la importancia de la producción de biopelículas a 3°C , esto se basó en que la mayoría de las heladeras hogareñas y las cámaras frías de las plantas productoras de alimentos funcionan a esta temperatura.

En la incubación a 10°C de temperatura las 5 cepas se adherieron en las 3 superficies en las 3 primeras horas de incubación. La mayor

concentración celular fue de *E. coli* O157 (PEAD, 3,45 log UFC/cm²) y la menor fue de *Salmonella* spp (AI, 2,04 log UFC/cm²).

A lo largo de la incubación (192 horas, 8 días) la mayor concentración bacteriana alcanzada fue en PTFE por *E. coli* O157 (6,25 log UFC/cm²). Los resultados obtenidos han mostrado similitud con trabajos publicados por otros investigadores. De hecho, existen publicaciones donde se informó el desarrollo de biopelículas de diferentes especies microbianas en, acero inoxidable, vidrio, gomas, diferentes plásticos, etc. (Jeong y col., 1994; Di Bonaventura y col., 2008; Ryu y col., 2005; Borges y col., 2018) a temperaturas entre 8 y 12°C y dentro de los 8 y 10 días.

El desarrollo de biopelículas a 10°C presentó diferencias significativas ($p < 0,001$) en los promedios de los recuentos bacterianos, en todos los tiempos de lectura y en todas las superficies estudiadas.

A esta temperatura la cantidad de cepas que ajustaron al modelo de Gompertz fue del 73,3% (no ajustaron *P. aeruginosa* en la tres superficies y *Listeria* spp. en PTFE). Con respecto a μ , el mayor valor fue para *Salmonella* spp. y *E. coli* con 0,17 [Log (UFC/cm²)/días]. Estos valores marcaron una gran diferencia con los obtenidos de las mismas cepas a 3°C. Las diferencias observadas en las enterobacterias entre los 3 y 10°C de incubación se podrían atribuir a su carácter mesófilo (35-37°C). En contraposición a *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. que poseen un comportamiento psicrófilo. Lo más notorio fue la diferencia de los valores de MPD, a 10°C el menor valor fue de 3,29 Log UFC/cm² y el mayor de

5,49 Log UFC/cm² comparado con el de *E. coli* a 3°C que fue de 2,53 Log UFC/cm².

Según los resultados obtenidos a 10°C, se dedujo que las concentraciones bacterianas alcanzadas por las biopelículas, fue uno de los eventos más importantes en relación a la inocuidad de los productos.

Las cepas de *E. coli* O157, *Listeria* spp y *Salmonella* spp. superaron las respectivas dosis infectivas mínimas (DIM). Cabe recordar que la DIM de *E. coli* O157:H7 puede ser de 10 hasta 100 UFC (ANMAT, 2011), *Salmonella* spp de 10⁵ a 10⁸ UFC/g, pudiendo variar según las características de la cepa y la resistencia del huésped (ANMAT, 2018).

La capacidad de producir biopelículas de las tres cepas estudiadas aumenta el riesgo de contaminación cruzada de los alimentos y podría facilitar la transferencia de bacterias por medio de la formación de aerosoles. Estos sucesos son de importancia no sólo en la contaminación de los alimentos. También podrían contaminar a los manipuladores provocando la diseminación de bacterias y la posterior formación de biopelículas en otros ambientes.

En la incubación a 25°C de temperatura, las 5 cepas se adhirieron a las 3 superficies en las 3 primeras horas de incubación. La mayor concentración se observó en PEAD por *E. coli* O157 (3,45 log UFC/cm²) y la menor concentración fue por *Salmonella* spp. en AI (2,04 log UFC/cm²).

A lo largo de toda la incubación (72 horas) la mayor concentración bacteriana alcanzada fue en AI por *E. coli* O157 (7,92 log UFC/cm²).

Estos datos coinciden con la bibliografía consultada (Ryu y col., 2005; Bonsaglia y col., 2014; Hernández Puga C., 2016).

Con la aplicación de la ecuación de Gompertz a los datos experimentales obtenidos a 25°C, se verificó el aumento de μ (1,33 [Log (UFC/cm²)/días]) en *E. coli*. El porcentaje de cepas que se ajustaron al modelo fue de 46,6%. Los valores obtenidos de las 5 cepas a 25°C, fueron muy superiores a los obtenidos en las otras temperaturas utilizadas. La mayoría de las cepas poseen características mesófilas y psicrótrofas, lo que favoreció el crecimiento a esta temperatura. Los valores correspondientes a MPD fueron muy similares a los obtenidos con los promedios reales.

La aplicación de los modelos matemáticos al promedio de los recuentos obtenidos de las biopelículas a diferentes temperaturas y superficies fue de carácter experimental. Esta idea se basó en tratar de esclarecer con la mayor exactitud posible la velocidad de crecimiento de las biopelículas en materiales que son utilizados diariamente en el proceso de producción de alimentos. Para la obtención de estas incógnitas se optó por la aplicación de la ecuación de Gompertz, que a partir de los parámetros generados se pueden obtener la velocidad específica de crecimiento, la duración de la fase de latencia y la máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares. Las biopelículas poseen muchos perfiles que influyen en el modelado matemático y uno de los problemas más importantes es la evolución del frente de la biopelícula. Según Conca (2007), esta es una de las

incógnitas del problema que hace que este fenómeno sea altamente no lineal. Este tipo de problemas fue denominado frontera libre (Conca y col., 2007). Por eso se consideró que en el futuro será necesario desarrollar estudios con diferentes ecuaciones que puedan expresar el comportamiento de las biopelículas en una superficie (Cumsille y col., 2014). López Núñez A. (2018) obtuvo resultados satisfactorios en su trabajo de tesis al utilizar modelos matemáticos como el método numérico para casos de una dimensión (modelo de Eberl) (Eberl y col., 2001) y los modelos de dos dimensiones para especies múltiples (modelo de Alpkvist y el modelo no lineal de desprendimientos y lineal para nutrientes) (Alpkvist y col. 2007).

Se determinó que microorganismos patógenos a la temperatura de 25°C pueden superar ampliamente la dosis infectiva mínima en un tiempo de 3 horas y formar biopelículas en los materiales ensayados. Estos datos fueron de gran importancia para implementar protocolos dirigidos a la prevención en la formación de biopelículas, cumplir con el objetivo de minimizar los riesgos de contaminación cruzada y garantizar la inocuidad de los productos.

En una cocina industrial al momento de comenzar las operaciones la temperatura oscila entre 25 y 27°C. En el momento de mayor producción la temperatura aumenta drásticamente superando los 30°C. Estas condiciones hacen que la permanencia de restos orgánicos en la superficies puedan convertirse en la película acondicionante (Díaz C.,

2011). Esto facilita la formación de una biopelícula que potencialmente podría contaminar el producto final.

“Desde el momento en que se comprobó que las bacterias patógenas podían ser parte de las biopelículas y así comportarse como un reservorio infeccioso...” (Shi y col., 2009), la industria alimentaria incrementó severamente sus esfuerzos para obtener una mejora continua en las BPM y en el *HACCP* con un objetivo final: controlar las biopelículas.

En las BPM y el *HACCP*, se encuentran desarrollados los diferentes procedimientos que aplicados en forma ordenada, logran productos con garantía de inocuidad. El desarrollo e implementación de los procedimientos denominados *cleaning in place (CiP)* (Sharma y col., 2002; Shi y col 2009) se basan en una minuciosa aplicación de limpieza y desinfección en un lugar definido y con personal altamente capacitado. Se ejecutan controles macroscópicos y se verifican con métodos microbiológicos ejecutados con estrictas frecuencias, que están sujetas a la aparición de desviaciones. En caso de presentarse *no conformidades* se procede a la aplicación de acciones correctivas (López Aguayo y col., 2010; Barreto y col., 2016; Kars R, 1995).

Resulta de gran importancia hacer una referencia sobre características de los materiales que fueron utilizados en este experimento. Los trozos de Al (obtenidos de bandejas en uso), PEAD (contenedores en uso) y PTFE (tablas de corte en uso), poseían ralladuras y marcas que se detectaban macroscópicamente. Estas

rugosidades influyeron para que el material orgánico quede retenido facilitando así la adhesión bacteriana (Stevens y col., 1993; Boulange-Peterman y col., 1997; Boid y col. 2001; Katsikogianni y col. 2004; Whitehead y col. 2005; Abalos C., 2005; Fuster i Valls, 2006; Díaz C., 2011). Todos los materiales que se utilizan en producción de alimentos están habilitados por las instituciones específicas que verifican su constitución y vida útil, uno de los aspectos esenciales que se deben controlar en una planta procesadora de alimentos. Por esto, la redacción de procedimientos que indiquen las condiciones límites del uso de las superficies, es una de las acciones a implementar con rapidez para prevenir futuros problemas en la sanitización.

Los resultados obtenidos en esta etapa se convierten en herramientas que aportan información indispensable para poder implementar una estrategia de sanitización para el control de las biopelículas.

ii. Método de tinción para la detección de biopelículas

El método de tinción resultó de utilidad para evaluar macroscópicamente el desarrollo de las biopelículas sobre las superficies. En el punto iii. d, se detalla como las biopelículas aumentaron su crecimiento conforme al incremento de la temperatura de incubación.

Con respecto a la identificación de biopelículas en los cortes de los tres materiales utilizados, la categoría 1 teñido difuso (color celeste) se

observó macroscópicamente a partir de 1,82 log UFC/cm². Este valor es muy cercano al valor promedio obtenido en la Etapa 1 (promedio 2,39 log UFC/cm²). Cuando la tinción se utilizó para identificar biopelículas en bandejas de servicio, se observó la persistencia de color en concentraciones de 1,61 log UFC/cm² correspondiente a la bandeja 19 (Gráfico 1).

Según los resultados obtenidos en éste estudio, se consideró que la utilización del cristal violeta para identificar macroscópicamente biopelículas en estos tipos de superficies, estaría en discusión ya que a bajas concentraciones no se puede observar la presencia de color. Se decidió que en el caso de utilizar la tinción, deberá ser verificada con un doble hisopado y realizar el exámen microbiológico.

iii. Aplicación de tres protocolos de limpieza y desinfección (LD)

En nuestro país el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) sugiere cumplir con lo indicado en la Directiva L165/48 (Comunidad Económica Europea, 2001), donde se establecen dos categorías para el estudio microbiológico de superficies en contacto con los alimentos. Los valores en los recuentos de RAM serán aceptables de 0-10 UFC/cm² y no aceptables a los >10 UFC/cm². Para el recuento de enterobacterias el valor aceptable será < 1 UFC/cm².

El control del medio ambiente y de las superficies que entran en contacto con los alimentos se convirtió en una de las operaciones de mayor relevancia mundial para prevención de las ETA. Linton A. (1983)

en “*Guidelines prevención and control of Salmonellosis part I and II*” indicaba que una superficie que contenga 3 UFC/cm², era muy bueno (condición higiénica); 3-9 UFC/cm², bueno; 10-29 UFC/cm², moderado; 30-90 UFC/cm²; malo. Estas sugerencias (al presente) son tenidas en cuenta por el Instituto de Salud Pública del Gobierno de Chile en el “Procedimiento recuento de microorganismos en suspensión por método de torunda en superficie” con fecha de revisión del 2008. Más tarde, Solberg y col (1990) sugerían que para superficies limpias los valores aceptables microbiológicamente eran < 5 UFC/6,8 cm² con una tolerancia de hasta 10 UFC/6,8 cm².

El gran desafío de este trabajo fue poder obtener una superficie limpia que no genere ningún tipo de riesgo para la salud. La estrategia de limpieza y desinfección consistió en utilizar productos químicos de fácil acceso, de bajo costo, de fácil aplicación y que se puedan adaptar a los procesos que se realizan diariamente en el Comedor Universitario de la Universidad Nacional de La Plata.

Los resultados obtenidos a partir de la utilización del detergente neutro y solución de hipoclorito de sodio 400 ppm (Protocolo 1) determinaron la ausencia de *Salmonella* spp, *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp y *P. aeruginosa* y el RAM nunca superó la cantidad de 4,44 UFC/cm² en todas las superficies estudiadas. Las dosis propuestas “*in vitro*” para el detergente y el desinfectante fueron efectivas y cumplieron con los valores en los recuentos de RAM sugeridos por los entes fiscalizadores.

Según los datos obtenidos en la consulta bibliográfica las concentraciones de uso del hipoclorito de sodio varían según al objetivo del protocolo de desinfección. En este caso, la dosis utilizada fue de 400 ppm, y se encuentra dentro del rango de uso cuando se pretende implementar una efectiva desinfección pos lavado de superficies (Rutala y col., 1997; Rutala y col., 2008; CDC I, 2008; CDC II, 2008; Lantagne y col., 2010). El detergente neutro y la solución de hipoclorito de sodio 400 ppm fueron eficaces, de bajo costo, fácil preparación y se adaptaron a las necesidades operativas del Comedor Universitario. Por estas cualidades se decidió su uso en el experimento de LD *“in situ”*.

El protocolo 2 consistió en la aplicación de catolito (*catolyte* o agua alcalinizada) al 50% y agua electroactivada al 100%. El catolito fue definido como una solución con poder detergente, sin espuma y de un pH de 11,5 a 12 que actúa como desengrasante (Mazzitelli J, 2013) y se utilizó como producto de limpieza. El agua electroactivada cumplió el rol de desinfectante (Huang y col., 2008; Duran H., 2010; Tabernero de Paz y col., 2013). En la etapa de lavado, en el momento en que las biopelículas entraban en contacto con la solución alcalina se desprendían en forma inmediata. No obstante, se respetó el protocolo y se realizó el cepillado. El resultado de los análisis bacterianos mostró la ausencia en todas las superficies de *Salmonella* spp, *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp y *P. aeruginosa* y el RAM no superó el valor de 4,44 UFC/cm². De esta manera este estudio *“in vitro”* se consideró exitoso ya que cumplió con lo sugerido por los entes fiscalizadores.

El detergente alcalino y ácido acético 2000 ppm (Protocolo 3) fue utilizado con la misma metodología que los anteriores. El ácido acético inhibe una gran cantidad de bacterias que colonizan las superficies (Forrest y col., 2007; Carranza y col., 2013). Es utilizado para la desinfección de superficies que están en contacto con alimentos en hogares, plantas de procesamiento, maquinarias y en soluciones del 2% en superficies de carcasas bovinas (Carranza y col., 2013; Pipek y col., 2005; Pipek y col., 2005). El resultado de los análisis bacterianos reveló la ausencia en todas las superficies de *Salmonella* spp, *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp y *P. aeruginosa* y el RAM no superó el valor de 4,44 UFC/cm². El estudio “*in vitro*” se consideró exitoso ya que cumplió con lo sugerido por los entes fiscalizadores.

CONCLUSIONES PARCIALES

- *P. aeruginosa* y *E. coli*, aisladas del contenedor de PEAD, pueden producir biopelículas en las tres superficies y a las tres temperaturas a las que fueron sometidas.
- Las de *E. coli* O157, *Salmonella* spp. y *Listeria* spp., formaron biopelículas en las tres superficies y a las tres temperaturas, superando las dosis infectivas mínimas necesarias para producir enfermedad.
- A 25°C las cepas de *E. coli*, *E. coli* O157 y *P. aeruginosa*, superaron los 3 log UFC/cm² en las tres superficies en las 3 primeras horas de incubación. *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. alcanzaron 2,8 log UFC/cm² en Al, y superaron los 3 log UFC/cm² en PEAD y PTFE en las 3 primeras horas de incubación.
- La tinción de cristal violeta al 1 %, mostró que a bajas concentraciones celulares <1,61 log UFC/cm² no se pudo observar macroscópicamente el color azul. Se consideró que en estos casos la tinción debe ser acompañada con un hisopado para verificar la presencia de biopelículas.
- Los 3 protocolos de LD utilizados en este estudio realizado “*in vitro*” produjeron resultados que cumplen con las directivas Nacionales e Internacionales referente a la limpieza y desinfección de superficies que están en contacto con los alimentos.
- El protocolo 2 (catolito al 50% y agua electroactivada al 100%) mostró que es eficaz en altas concentraciones. No resulta

conveniente en términos operativos y económicos para el Comedor Universitario. En pequeños emprendimientos sería un protocolo de elección.

- El protocolo 3 (detergente alcalino y ácido acético 2000 ppm) es eficaz pero el costo del ácido acético se convierte en una limitación debido a la escala de la operatividad del Comedor Universitario.
- El protocolo 1 (detergente neutro y solución de hipoclorito de sodio 400 ppm) es eficaz, de bajo costo, fácil preparación y se adapta a las necesidades operativas del Comedor Universitario.

ETAPA 3

Aplicación y verificación “*in situ*” (Comedor Universitario) del protocolo de sanitización elegido “*in vitro*”.

Objetivo específico:

- Aplicar y verificar *“in situ”* (Comedor Universitario) el protocolo de sanitización más efectivo obtenido *“in vitro”* sobre las superficies estudiadas.

Materiales y métodos

i. Toma de muestra

Lugar: Comedor Universitario, calle 50 y 116 Sede 1, “Bosque Oeste”.

Protocolo de LD: Detergente neutro (concentración indicada por el proveedor) y solución de Hipoclorito de Sodio 400 ppm.

Método de toma de muestra para el estudio microbiológico: las muestras fueron obtenidas de superficies secas, post aplicación del protocolo de Limpieza y Desinfección. Se utilizó hisopado doble (Britania, Buenos Aires, Argentina) en 5 ml de caldo Lethen (Britania, Buenos Aires, Argentina). En cuanto a la técnica de hisopado, primero se utilizó el hisopo seco, apoyando y deslizando de un lado otro de la superficie, 10 veces de arriba hacia abajo; giro del hisopo y otras 10 veces de lado a lado. Con el segundo hisopo esta vez húmedo con caldo Lethen (Britania, Buenos Aires, Argentina) se procedió de la misma forma. La superficie a estudiada fue de 25 cm² (5 x 5 cm). Ambos hisopos se depositaron en el mismo tubo y se consideró la misma muestra. Posteriormente se transportaron refrigerados al Laboratorio de Microbiología de Alimentos FCV-UNLP para el análisis (Valdez Duque B., 2008).

Número de muestras por día de trabajo: se procesaron 40 muestras por día; 20 muestras de superficies de Al (Bandejas de servicio), 10 muestras de superficies de PEAD (Contenedores) y 10 muestras de superficies de PTFE (tablas de corte). El número total de

muestras fue de 100 bandejas de servicio, 50 contenedores de PEAD y 50 de tablas de PTFE. Se seleccionó 1 bandeja/contenedor/tabla cada 5 bandejas/contenedores/tablas lavados y secos.

ii. Estudios microbiológicos

- Recuento de aerobios mesófilos (RAM). Esta metodología fue descrita en la página 59 (iv), Etapa 1.

- Estudio de *E. coli* O157 y *Salmonella* spp

Para el estudio de *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. se realizaron grupos de 10 muestras de las cuales se tomó 0.1 ml de cada una (total 1 ml.) y se inoculó en 9 ml caldo TSBm adicionado con novobiocina 20 µg/ml (Acumedia Manufacturers, EE.UU.) y 9 ml agua peptonada bufferada (Britania, Buenos Aires, Argentina). Se incubaron durante 6 horas a 41 y 37°C respectivamente. Se les realizó un tamizaje con el *E. coli* O157 test kit (DuPont, Wilmington, USA) y para *Salmonella* spp. se utilizó el *RapidChek*® *SELECT*™ (Sdix, Strategic Diagnostics Inc. 111 Pencader Drive Newark, USA).

- Estudio de *Listeria* spp.

Se utilizó la metodología descrita por la ISO 11290-1:2004 en ANMAT (2013). Un mililitro de cada grupo de 10 se depositó en un tubo con 10 ml en el pre-enriquecimiento con “caldo *half* Fraser” (caldo Fraser a la mitad de la concentración) (Acumedia, Manufacturers, EE.UU.) y se incubó 24 horas a 30°C. Se inocularon 0,1 ml de cultivo en 10 ml de caldo Fraser (para el enriquecimiento secundario con agentes selectivos a la

concentración normal) y se incubó de la misma forma. Terminada la incubación, se sembró en superficie en los medios agar *Listeria* de acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA, Acumedia, Manufacturers, EE.UU.) y PALCAM (Acumedia, Manufacturers, EE.UU.). Las colonias que mostraron características fenotípicas similares a las de *Listeria* fueron repicadas al medio sólido tripticasa de soya (Acumedia, Manufacturers, EE.UU.). Para la identificación de *Listeria* spp se realizó la prueba de la catalasa, Coloración de Gram, Prueba de la movilidad, Test de hemólisis, Utilización de carbohidratos (ramnosa y xilosa), Prueba de CAMP (Christie- Atkins- Munch-Peterson).

iii. Diagrama de flujo de las bandejas de servicio, contenedores de PEAD y tablas de PTFE en el comedor Universitario de la UNLP

- Bandejas de servicio

Terminado el producto, se sirve en las bandejas con el vaso de agua, los cubiertos, el pan, servilleta y la fruta. El comensal se dirige a la mesa, almuerza y al finalizar deja la bandeja con los restos en la mesada de lavado. Los operarios realizan la LD. Al finalizar dejan escurrir la bandeja en contenedores cribados y entra en el circuito nuevamente. Esto se repite 4 veces por día y en el último lavado se almacena hasta el otro día (Figura 10).

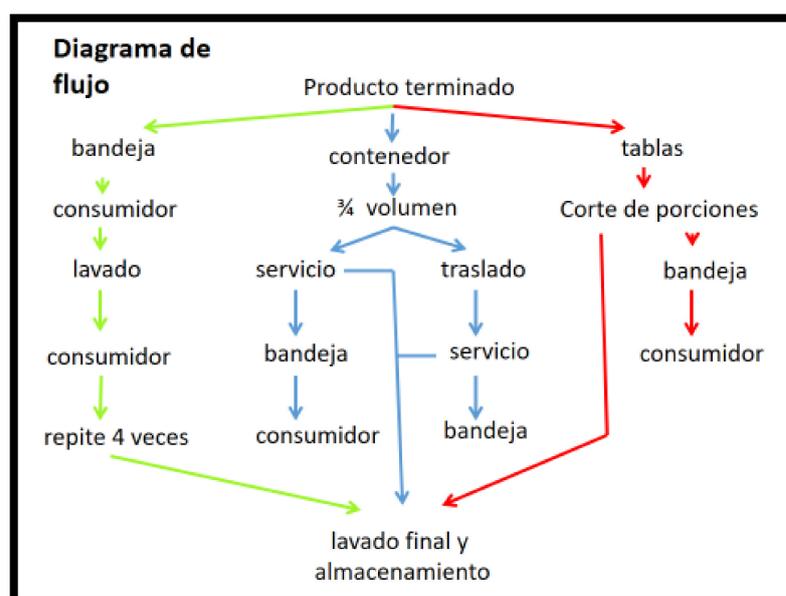
- Contenedores de PEAD

Terminado el producto, se deposita en el contenedor hasta los tres cuartos de su volumen y toma dos rutas. A: se cubre con la tapa y se traslada en camioneta a las otras sedes. Una vez terminado el uso, se aplica la LD en la sede y se transporta vacío al comedor base, donde se almacena hasta el servicio. B: se deposita hasta los tres cuartos de su volumen y se traslada en *zorra* hasta la barra de servicio. Una vez terminada la comida, se aplica la LD y se almacena hasta el servicio (figura 10).

- Tablas de PTFE

Terminado el producto, se corta sobre las tablas, se sirve en las bandejas y se entrega al consumidor. Una vez terminado el uso, se aplica la LD y se almacenan hasta el servicio (figura 10).

Figura 10: Diagrama de flujo de bandejas de servicio, contenedores de PEAD y tablas de PTFE.



a. Diagramación del lavado y desinfección de bandejas de servicio según la disposición de piletas en el Comedor Universitario (figura 11).

- Recepción de bandeja: el comensal deja la bandeja con restos de comida en la mesada (1). El operario toma la bandeja y con un cepillo mojado con la solución de detergente, descarta en un contenedor todos los restos (2).
- Lavado: Cepillado de toda la superficie entre 7 y 10 veces y se sumerge en pileta fija entre 10 y 15 minutos en la solución de detergente (3).
- Enjuague: se realiza en pileta fija con agua potable a 75°C (4).
- Desinfección: se llena un contenedor cribado de bandejas y se sumergen en pileta móvil con la solución desinfectante (hipoclorito de sodio) durante 15 minutos (5).
- Enjuague: en pileta móvil con agua potable a 75°C (6) y se estiba para el escurrido y secado (7). Seguido, pasa a servicio o estibado.

b. Diagramación del lavado y desinfección de contenedores de PEAD según la disposición de piletas en el Comedor Universitario (Figura 12).

- Llega el contenedor vacío con restos de comida, el operario con un cepillo mojado en la solución de detergente descarta todos los restos en un contenedor (1).
- Lavado: cepillado y restregado con esponjas de metal con la solución de detergente, se espera el tiempo de acción (10 minutos) (2) y se enjuaga con agua potable a 75°C (3).
- Desinfección: se aplica la solución de hipoclorito de sodio 400 ppm por aspersion (4) y se estiban hasta requerir su uso (5).
- Enjuague: se le aplica un enjuague (6) con agua potable ante de usar (7).

Figura 11: Diagramación del lavado y desinfección de bandejas de

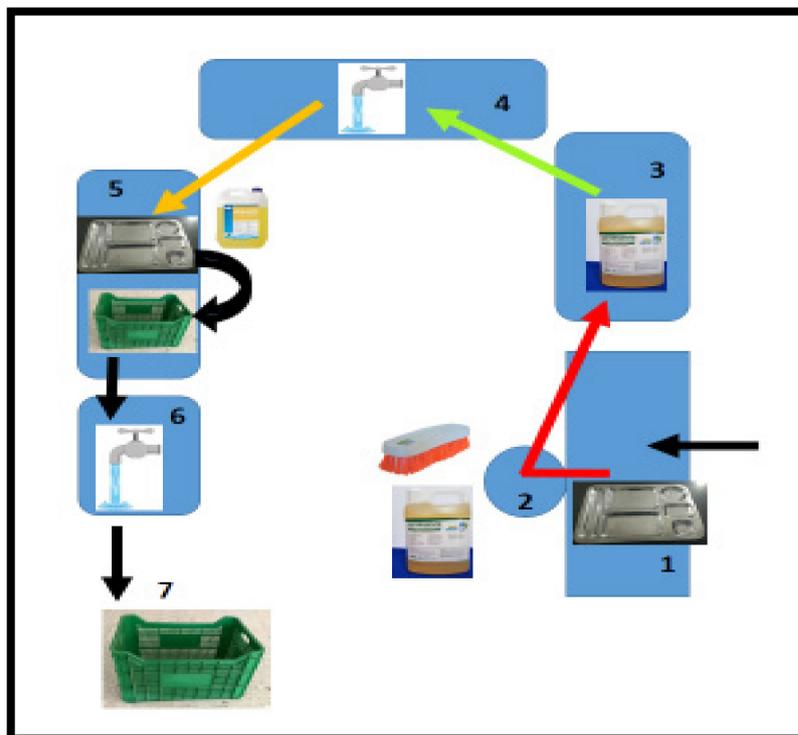
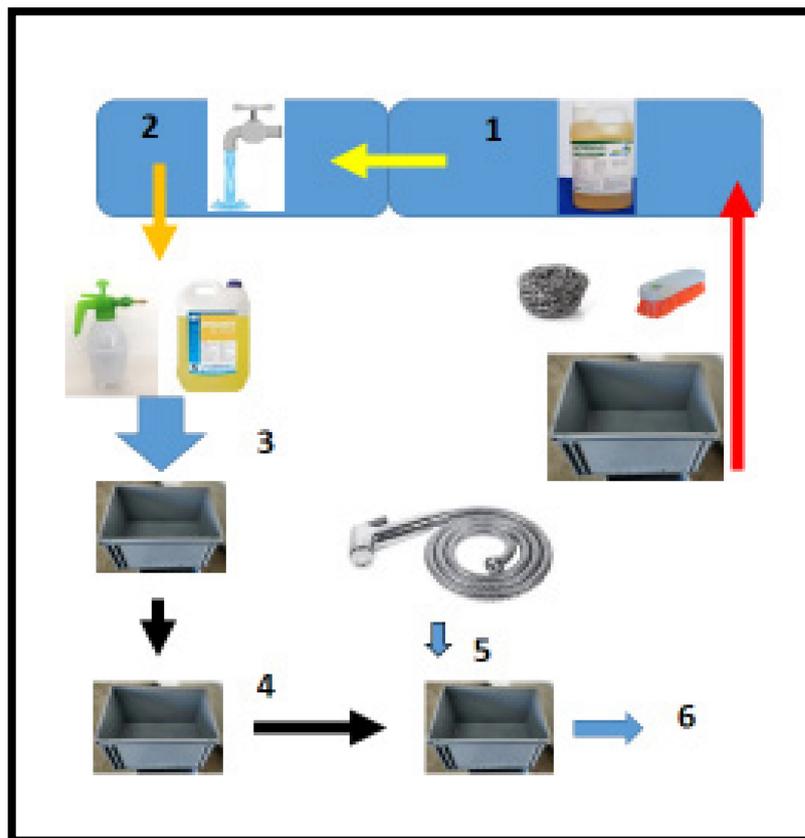


Figura 12: Diagramación del lavado y desinfección de contenedores de PEAD



c. Acción correctiva aplicada en el lavado y desinfección de los contenedores de PEAD.

Modificación del flujo operativo (Figura 13)

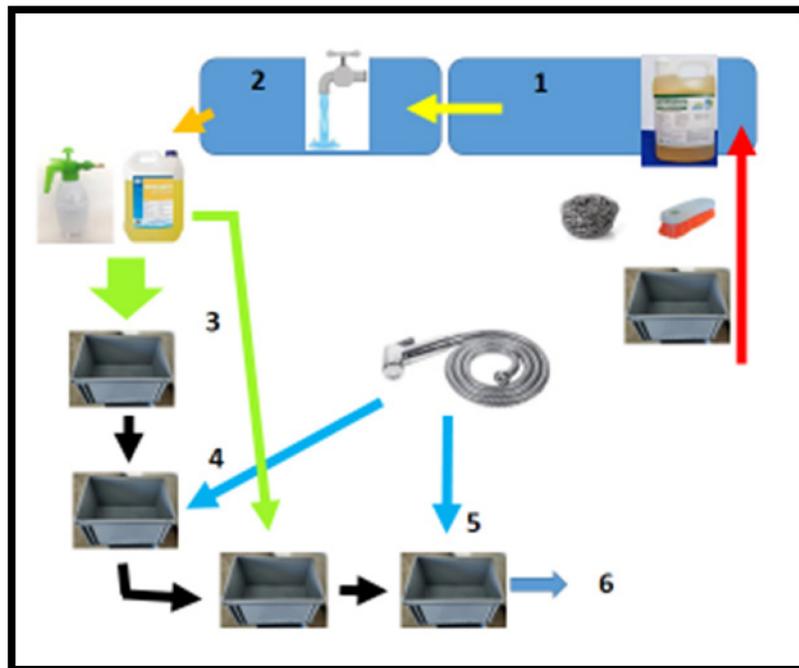
A partir de la desinfección:

- Desinfección: se aplica la solución de hipoclorito de sodio 400 ppm por aspersion y se deja actuar al menos 30 minutos.
- Enjuague con agua a 75°C. Se deja escurrir durante al menos 5 minutos. Se aplica por segunda vez el

procedimiento de desinfección y se estivan hasta el uso, abertura abajo.

- Enjuague con agua potable ante de usar (6).

Figura 13: Modificación del flujo operativo a partir de la desinfección

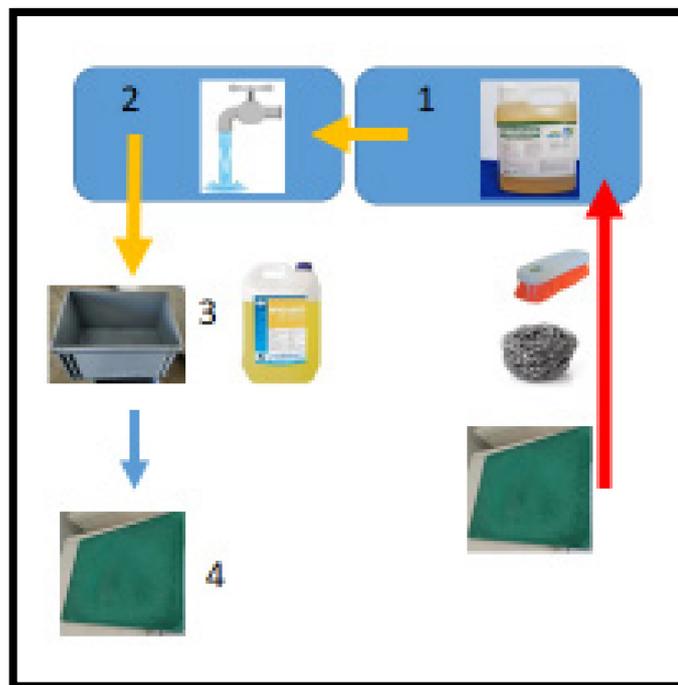


d. Diagramación del lavado y desinfección de las tablas de PTFE según la disposición de piletas en el Comedor Universitario (Figura 14).

- Llega la tabla con restos orgánicos, el operario con un cepillo mojado en la solución de detergente, descarta todos los restos en un contenedor (1).
- Lavado: cepillado y restregado con esponjas de metal con la solución de detergente, se espera (10 minutos) (2) y se enjuaga con agua potable a 75°C (3).

- Desinfección: se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio 400 ppm en un contenedor de PEAD destinado para esa labor (3) durante 30 minutos, se secan y se estiban hasta requerir su uso (4).

Figura 14: Diagramación del lavado y desinfección de tablas de PTFE según la disposición de piletas en el Comedor Universitario.

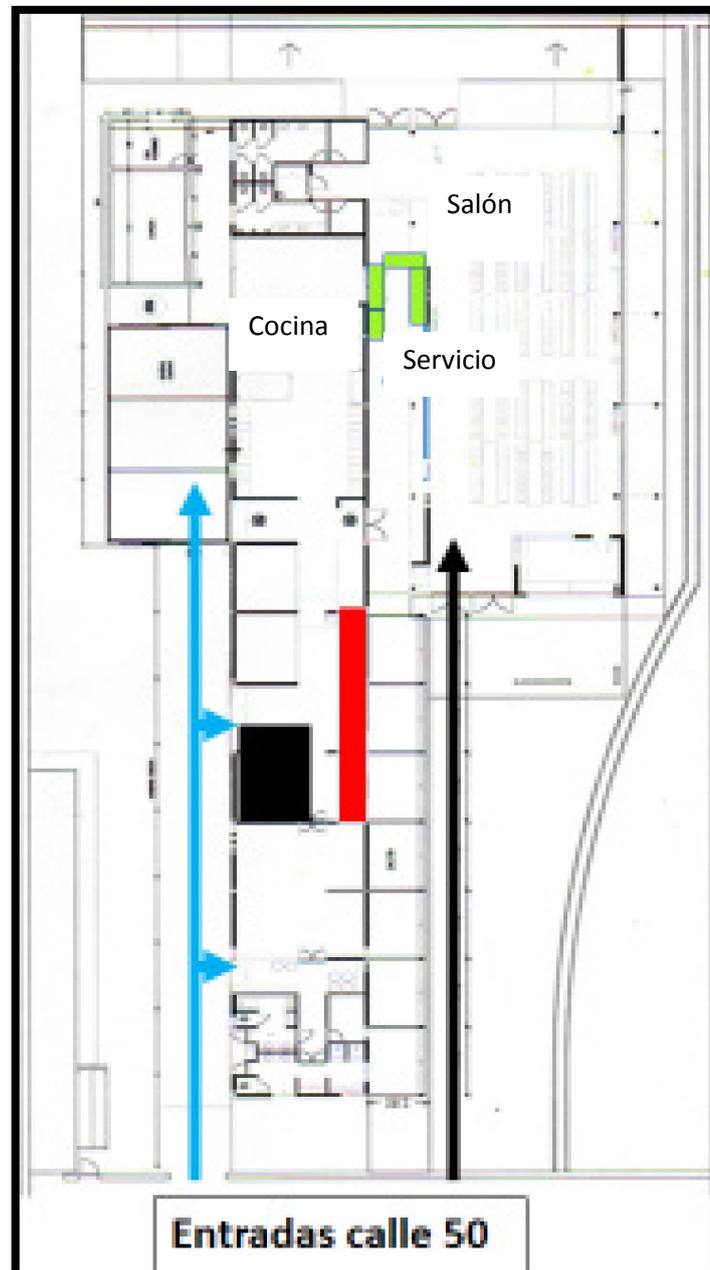


e. Ubicación de los lugares de lavado en el plano del Comedor Universitario calle 50 sede 1 Bosque Oeste (figura 15).

El color verde señala las cuatro piletas (dos fijas y dos móviles) destinadas para el lavado de bandejas, cubiertos y vasos destinados al servicio diurno. En rojo se señalan las seis piletas destinadas al lavado de los contenedores de PEAD, tablas de corte, instrumentos, etc. En celeste

se indica la entrada del personal y materia prima y en negro la entrada de comensales.

Figura 15: Ubicación de los lugares de lavado en el plano del Comedor Universitario calle 50 sede 1 Bosque Oeste



Resultados

i. Resultado de los análisis bacteriológicos en superficies de Al

En el gráfico 11 se muestran los resultados de los 100 análisis microbiológicos de RAM, de las muestras extraídas de las superficies de las bandejas de Al, durante 5 días. Los valores de los recuentos son el resultado de la aplicación de la fórmula 1 y están expresados en UFC/cm².

Post aplicación del protocolo 1 en las superficies de Al, el mayor valor individual obtenido fue de 4 UFC/cm² (se repitió 3 veces el día martes y el número de las muestras fue: 10, 17 y 20).

En el gráfico 12 se muestran los promedios diarios obtenidos en la semana de trabajo. De los 5 valores promedios obtenidos en las superficies de Al, el jueves fue el día que se registró el mayor valor (1,52 UFC/cm²).

Los resultados microbiológicos para *E. coli* O157, *Salmonella* spp y *Listeria* spp, fueron negativos.

ii. Resultado de los análisis bacteriológicos en contenedores de PEAD.

En el gráfico 13 se muestran los resultados de los 50 RAM de las muestras extraídas de los contenedores de PEAD durante 5 días. Los valores de los recuentos son el resultado de la aplicación de la fórmula 1 y están expresados en UFC/cm².

Post aplicación del protocolo 1 en las superficies de PEAD, el mayor valor individual obtenido fue de 10 UFC/cm² (se repitió 2 veces el día lunes y el número de las muestras fue: 7 y 9).

A partir del martes y con la aplicación de la medida correctiva denominada “protocolo 1 modificado” el mayor valor obtenido fue de 5 UFC/cm² (muestra N° 22, día miércoles), los restantes valores estuvieron por debajo del valor de la muestra N° 22.

En el gráfico 14 se muestran los promedios diarios obtenidos en la semana de trabajo. El promedio del día lunes fue de 6,4 UFC/cm², pero a partir de la aplicación de la medida correctiva “protocolo 1 modificado” los resultados obtenidos en los siguientes días cambiaron en forma abrupta. Entre los días martes, miércoles, jueves y viernes, el mayor promedio obtenido fue de 2,60 UFC/cm² (jueves).

Los resultados microbiológicos para *E. coli* O157, *Salmonella* spp y *Listeria* spp, fueron negativos.

iii. Resultado de los análisis bacteriológicos en tablas de PTFE

En el gráfico 15 se muestran los resultados de los 50 RAM de las muestras extraídas de las superficies de las tablas de PTFE durante 5 días. Los valores de los recuentos son el resultado de la aplicación de la fórmula 1 y están expresados en UFC/cm².

Post aplicación del protocolo 1 en las superficies de PTFE, el mayor valor obtenido fue de 4 UFC/cm² y se repitió 2 veces (día lunes, muestra 8 y el miércoles, muestra 37). En el gráfico 16 se muestran los

promedios diarios obtenidos en la semana de trabajo. Los resultados microbiológicos para *E. coli* O157, *Salmonella* spp y *Listeria* spp, fueron negativos.

Gráfico 11: Valores en UFC/cm² obtenidos en superficies de Al en 100 muestras, post aplicación del protocolo 1.

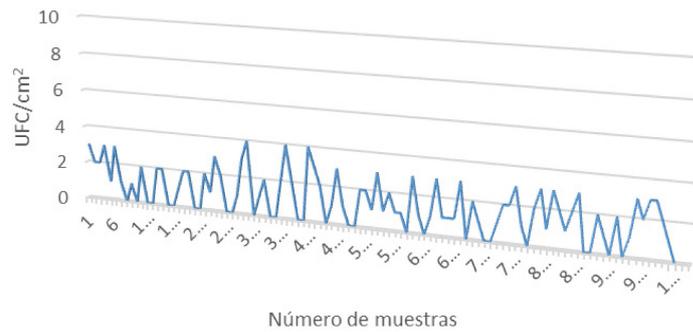


Gráfico 12: Valores en UFC/cm² obtenidos en superficies de PEAD en 50 muestras, post aplicación del protocolo 1 (hasta el valor rojo) y protocolo 1 modificado (después del valor rojo).



Gráfico 13: valores en UFC/cm² obtenidos en superficies de PTFE en 50 muestras, post aplicación del protocolo 1.

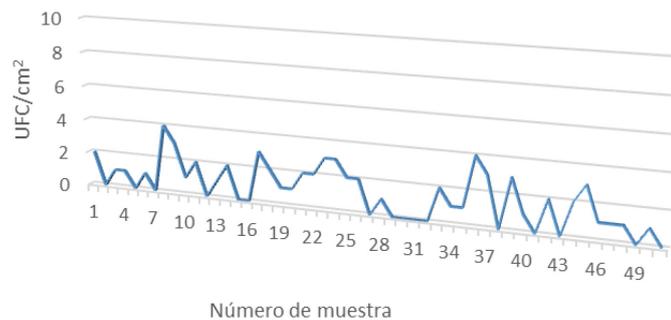
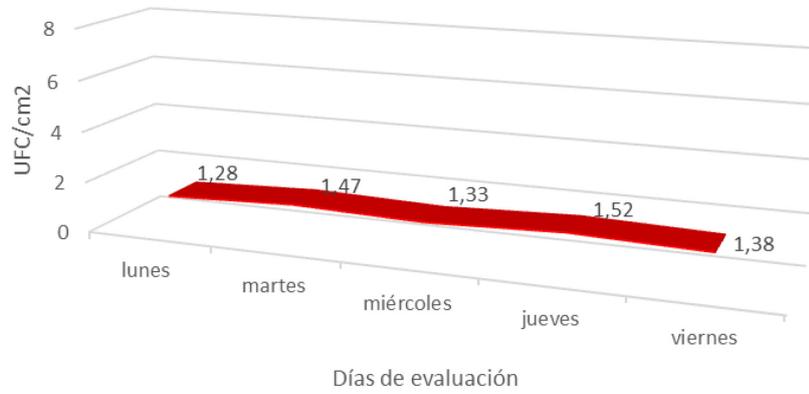


Gráfico 14: Promedio diario UFC/cm² en superficies de AI (a), PEAD (b) y PTFE (c) post aplicación del protocolo 1 y del protocolo 1 modificado.

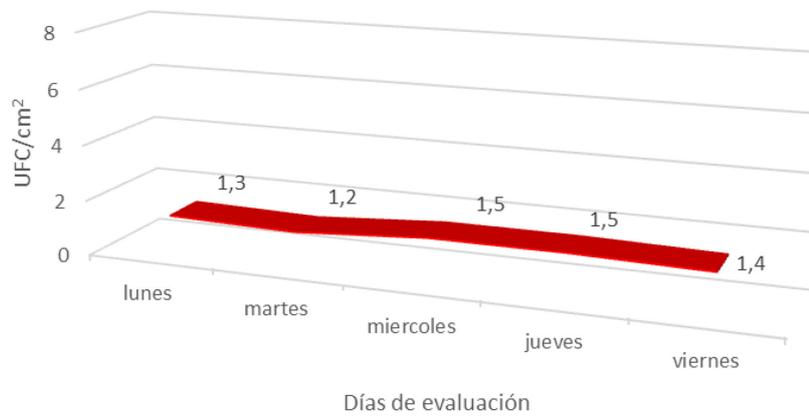
(a)



(b)



(c)



Discusión

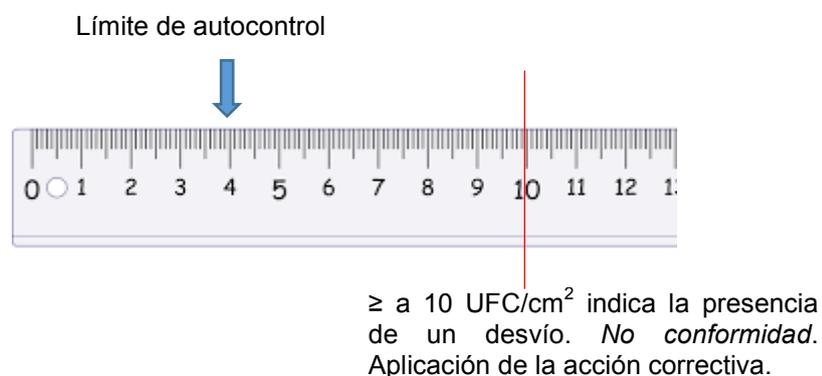
El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria del Ministerio de Agroindustria de la Nación Argentina, emitió la circular 4176 donde el inciso 1 es el Documento de Orientación sobre la aplicación de determinadas disposiciones del reglamento (CE) 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables en productos (2015). Esta circular se basa en la Decisión de la Comisión del 8 junio del 2001 (Comunidad Económica Europea, 2001), respecto a los criterios microbiológicos. En este documento se expresan los valores establecidos para los RAM (criterio recomendatorio) entre 0-10/cm² (valor aceptable) >10/cm² (valor inaceptable) y para enterobacterias 0-1/cm² (valor aceptable) >1/cm² (valor inaceptable). En nuestro país todo productor de alimentos que vaya a exportar hacia la comunidad europea, deberá cumplir con esta circular.

A partir del análisis realizado a la normativa vigente, se deduce que el criterio complementario (recomendatorio) podría ser atribuido al valor estipulado por la Decisión de la Comisión del 8 de junio de 2001, que es de 0 a 10 UFC/cm² para los RAM y de 0 a 1 UFC/cm² para enterobacterias. Para cumplir con el criterio obligatorio, la condición sería la ausencia de microorganismos patógenos en superficie. Este trabajo se ajustó a los valores asignados por los entes fiscalizadores para los criterios mencionados.

i. Acero Inoxidable

Los resultados obtenidos en AI post aplicación del Protocolo 1, cumplieron con los límites microbiológicos establecidos en la circular 4176 (Cabrera J., 2013) y las superficies de AI se consideraron higiénicamente aceptables. Por lo tanto se sugiere que el límite microbiológico propio (límite en autocontrol) sea de 4 UFC/cm² y que el límite microbiológico **m** (letra que identifica la cantidad que distingue los valores aceptables de los no aceptables) sea ≥ 10 UFC/cm². Si **m** fuese superado o igualado, dará origen a un desvío, esto dará lugar a la *no conformidad* y a la aplicación de la acción correctiva (ICMSF, 2002, ANMAT, 2018) (figura 16)

Figura 16: Límites en autocontrol y m



En la tabla 42 se muestran los valores obtenidos en la Etapa 1 y los del protocolo 1.

Tabla 42: Valores de los RAM en la Etapa 1 y protocolo 1 en superficies de AI.

Protocolos	Mayor valor obtenido	Valor promedio
Etapa 1	3,17 log UFC/cm ²	2,23 log UFC/cm ²
Protocolo 1	0,60 log UFC/cm ²	0,18 log UFC/cm ²

Con respecto a los resultados de *E. coli* O157, *Salmonella* spp y *Listeria* spp. fueron negativos. De esta manera se cumplió con el criterio microbiológico obligatorio (ANMAT, 2018).

Es importante mencionar que en cuanto al desinfectante y la dosis utilizada, varios autores coincidieron en que la dosificación de 400 ppm del protocolo 1 era útil para este tipo de operaciones (Rutala y col., 1997; Rutala y col., 2008; CDC I, 2008; CDC II, 2008).

ii. PEAD

En PEAD los resultados de los RAM el día lunes, marcaron un desvío y por lo tanto se consideró como una *no conformidad* para el protocolo 1 que dio lugar a la aplicación de una acción correctiva. Esta decisión es la indicada cuando son igualados o superados los límites establecidos en los criterios microbiológicos complementarios (ANMAT, 2018; Cabrera J. 2013).

La decisión de aplicar el protocolo 1 modificado (acción correctiva), se basó en tres puntos:

1. La solución de hipoclorito de sodio 400 ppm que se utilizó en la primera desinfección podría haber reaccionado con material orgánico presente en las ranuras del PEAD y por lo tanto no haber podido actuar sobre la totalidad de las biopelículas ubicadas dentro de las “rugosidades” (Fuster i Valls, 2006, Whitehead y col. 2005; Díaz C., 2011). Ruiz Bolívar y col. (2008) aconsejan hacer varios ciclos de desinfección, ya que la

primera aplicación remueve la capa superior de células, separándola de las más persistentes.

2. Otro de los motivos del desvío es que el lavado de los contenedores es muy difícil e incómodo para el operario. Por eso se están probando cepillos con diferentes largos y dureza de cerdas. También se trabaja en la capacitación, ensayando distintas modalidades para mejorar la técnica de limpieza (OPS, 2018).
3. El desgaste de los contenedores fue un problema a resolver. Se decidió hacer una evaluación de todos los contenedores en uso y se sugirió el cambio del 50% de ellos. Esta maniobra fue acompañada con un entrenamiento "*in situ*" de los encargados de cada sede.

Mientras se evaluaba el pedido de los nuevos contenedores, se instaló el protocolo modificado 1 (aplicar un nuevo enjuague con agua a presión a 75°C, dejar escurrir y aplicar la desinfección por segunda vez y dejar en contacto la solución de hipoclorito de sodio más tiempo).

Los resultados obtenidos del protocolo 1 modificado mostraron una gran reducción en los RAM, ubicando los valores individuales en la mitad de los límites microbiológicos complementarios. En la tabla 43 se muestran los valores obtenidos en la Etapa 1, el protocolo 1 y el protocolo 1 modificado.

Tabla 43: Valores obtenidos en los RAM en la Etapa 1, protocolo 1 y protocolo 1 modificado en superficies de PEAD.

Protocolos	Mayor valor obtenido	Valor promedio
Etapa 1	5,21 log UFC/cm ²	4,88 log UFC/cm ²
Protocolo 1	1,00 log UFC/cm ²	0,80 log UFC/cm ²
Protocolo 1 modificado	0,69 log UFC/cm ²	0,41 log UFC/cm ²

Los resultados del protocolo 1 no se consideraron aceptables en las condiciones de trabajo actuales. Quizás pueda ser utilizado en superficies de PEAD en mejores condiciones. El protocolo 1 modificado, cumplió con los límites microbiológicos complementarios y podría ser favorable su implementación en los procesos. Se sugiere que el límite microbiológico propio (límite en autocontrol) sea de 5 UFC/cm² y que el límite microbiológico **m** se le atribuya el valor de ≥ 10 UFC/cm².

Con respecto a los resultados obtenidos en los estudios de *E. coli* O157, *Salmonella* spp y *Listeria* spp. todos fueron negativos (protocolo 1 y protocolo 1 modificado). De esta manera cumplieron con el criterio microbiológico obligatorio (ANMAT, 2018).

iii. PTFE

En las tablas de PTFE los resultados obtenidos en los RAM, estuvieron por debajo de los esperados en el plan de trabajo, por lo que el protocolo 1 cumplió límites microbiológicos indicados por **m** (≥ 10 UFC/cm²).

Esto puede ser atribuido a que el lavado de las tablas de PTFE no es cómodo a los operarios y pueden efectuarlo de manera fácil y rápida. La

desinfección no fue afectada por el tiempo de contacto ya que en dos contenedores de PEAD se sumergen todas las tablas en uso.

En la tabla 44 se muestran los valores obtenidos en la Etapa 1 y los resultados del protocolo 1.

Tabla 44: Valores obtenidos en RAM en la Etapa 1 y protocolo 1 en superficies de PTFE.

Protocolos	Mayor valor obtenido	Valor promedio
Etapa 1	3,17 log UFC/cm ²	2,23 log UFC/cm ²
Protocolo 1	0,60 log UFC/cm ²	0,25 log UFC/cm ²

Por lo tanto se sugiere que el límite microbiológico propio (límite en autocontrol) sea de 4 UFC/cm² y que al límite microbiológico **m** se le atribuya el valor de ≥ 10 UFC/cm².

Los resultados obtenidos para *E. coli* O157, *Salmonella* spp y *Listeria* spp. fueron negativos. De esta manera cumplieron el criterio microbiológico obligatorio.

Conclusiones parciales

- Los valores de RAM obtenidos en las superficies de Al cumplieron con los límites establecidos en los criterios microbiológicos complementarios, sugiriéndose como límite microbiológico propio (límite en autocontrol) el valor de 4 UFC/cm² y que el límite microbiológico **m** (cantidad que distingue aceptables de defectuosas) de ≥ 10 UFC/cm².
- En las bandejas de servicio el protocolo 1 fue efectivo, aplicable, repetible y auditable, a pesar de la velocidad con que se aplica y a la cantidad de bandejas que se someten a la LD. Se consideró altamente recomendable su aplicación.
- Los resultados del protocolo 1 en PEAD no se consideraron aceptables en las condiciones de trabajo actuales (estado de las superficies). Estos quizás puedan ser utilizados en superficies bajo control de desgaste.
- El protocolo 1 modificado cumplió con los límites microbiológicos complementarios, por lo que sería muy favorable su implementación en los procesos en el Comedor Universitario.
- El control y el recambio programado de los contenedores de PEAD, es una operativa que debe implementarse con el fin de mejorar los procesos y facilitar la LD.
- La aplicación del protocolo 1 en las superficies de PTFE, cumplió con los límites microbiológicos complementarios. Se

sugiere como límite microbiológico propio (límite en autocontrol) sea de 4 UFC/cm² y que al límite microbiológico **m** se le atribuya el valor de ≥ 10 UFC/cm². El protocolo 1 fue: efectivo, aplicable, repetible y auditable.

CONCLUSIONES FINALES

(ETAPA 1, ETAPA 2 Y ETAPA 3)

1. Las cinco cepas que se utilizaron en este trabajo formaron biopelículas en todas las superficies y a todas las temperaturas. La cepa de *E. coli* aislada de un contenedor de PEAD no poseía características patógenas, por lo que se la consideró como indicador de contaminación fecal indirecta. Las cepas *E. coli* O157, *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. se adaptaron y formaron biopelículas que superaron ampliamente la dosis infectiva mínima. Esto encendió una alarma que nos obligó a esforzarnos en los controles, ya que las tres cepas fueron aisladas de lugares que fueron abastecidos por los mismos proveedores.
2. La temperatura fue un factor que incidió decisivamente en el crecimiento de las biopelículas. A 3°C, *Listeria* spp. y *P. aeruginosa* se adhirieron a las superficies y superaron los 2 log UFC/cm² después de las 12 horas. *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* se adhirieron a las 12 y 24 horas, pero el crecimiento de *E. coli* mostró diferencias significativas ($p > 0,05$). En este caso, la presencia de estos microorganismos en lugares con bajas temperaturas estarían generando un alto riesgo de contaminación cruzada, de modo que la aplicación de una LD efectiva controlaría los riesgos tanto en cámaras frías como en heladeras hogareñas.
3. En las incubaciones a 10 y 25°C, las cinco cepas aumentaron la velocidad específica de crecimiento (μ) y la máxima densidad

poblacional microbiana (MPD), logrando la adhesión a las 3 horas y superaron las dosis infectivas mínimas entre las 6 y 10 horas de incubación a 10°C y a las 3 horas a 25°C. Con estos resultados, queda claro que una falla en la LD permitirá que permanezcan restos orgánicos y que a la temperatura ambiental de la cocina, permitirá que en 3 horas se forme una biopelícula.

4. La tinción con cristal violeta fue una herramienta muy útil para observar el crecimiento de las biopelículas en las tres superficies y a diferentes temperaturas. Cuando se utilizó para la identificación de biopelículas en superficies (Etapa 1) los resultados microbiológicos obtenidos de las superficies teñidas mostraron una alta concentración bacteriana. La limitante que se encontró en el uso de esta técnica, es que macroscópicamente no se detectó el color azul por debajo de 1.61 log UFC/cm² que equivale a 41 UFC/cm². En la Etapa 2 los límites de visibilidad de color para *E. coli* O157 en AI fue de 1,82 log UFC/cm² (66,6 UFC/cm²) y para *Listeria* spp en PTFE de 1,89 log UFC/cm² (77 UFC/cm²). Estos valores de RAM superan a los requeridos por la Directiva L165/48 (2001), indicando que a muy bajas concentraciones la utilización de la tinción con cristal violeta estará sujeta a la realización de un hisopado y posterior estudio microbiológico para verificar el resultado.
5. Los tres protocolos mostraron su efectividad tanto en la limpieza como en la desinfección. Es importante resaltar que en el

experimento se los enfrentó a biopelículas que en algunos casos superaban 7 log UFC/cm². La elección del protocolo 1 (Detergente neutro y la solución de Hipoclorito de Sodio 400 ppm) se basó en cuatro ventajas. 1) Alta capacidad de limpieza y desinfección. 2) Fácil acceso y bajo costo por la abundante oferta en la ciudad. 3) Fácil de preparar y de bajo riesgo para los operarios. 4) Los resultados microbiológicos obtenidos cumplen con la Directiva L165/48 (2001).

6. El protocolo de LD desarrollado e implementado *in situ* resultó efectivo en las superficies de Al y PTFE y dio lugar a determinar los límites microbiológicos de autocontrol en esas dos superficies (4 UFC/cm²). Estos límites microbiológicos se encuentran muy por debajo de los recomendados por la Directiva L165/48 (2001) (10 UFC/cm²).
7. El protocolo de LD desarrollado e implementado *in situ* no alcanzó a satisfacer los requerimientos propuestos para las superficies de PEAD. Se implementó el protocolo 1 modificado que cumplió con los límites microbiológicos recomendados. Se pudieron determinar los valores de autocontrol en la superficie de PEAD (5 UFC/cm²) que se encuentran muy por debajo de los recomendados por la Directiva L165/48 (2001) (10 UFC/cm²).
8. Este trabajo generó ideas de cambio para modernizar y mejorar el funcionamiento general del Comedor Universitario. Se decidió continuar con el estudio de la detección temprana de biopelículas

para agilizar la identificación y aplicar los métodos necesarios para su control.

Se continuará experimentando otros métodos de sanitización para poder definir cuál es el que brindará la mayor seguridad en las operaciones para obtener un producto inocuo.

Se desarrollará junto a un equipo multidisciplinario una estrategia de capacitación áulica e *in situ* para satisfacer e incrementar conocimientos en los operarios.

Estas conclusiones se basan en el espíritu de *la mejora continua* que es la base de la superación personal aplicada al contexto grupal para cumplir con los derechos de un individuo: el acceso al alimento, un lugar prolijo con atención amable y la garantía en todo momento del cuidado de su salud.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ábalos C. Adhesión bacteriana a biomateriales. Av Odontostomatol vol.21 no.1 Madrid. 2005.
- 2) Ahimou F, Semmens MJ, Novak PJ, Haugstad G. Biofilm cohesiveness measurement using a novel atomic force microscopy methodology. 2007. Appl Environ Microbiol 73:2897–904.
- 3) Alimentos Argentinos. 2018. Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/>
- 4) Alonso A. Uso de desinfectantes. Guías para la prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. 2007. Disponible en: https://www.insst.es/documents/94886/326962/ntp_429.pdf/353cf0a5-b164-4f6f-b53b-3124b0c90302
- 5) Alpkvist E, Bengtsson J, Overgaard NC, Christensson M, Heyden A. Simulation of Nitrification of Municipal Wastewater in a Moving Bed Biofilm Process: A Bottom-Up Approach Based on a 2D-Continuum Model for Growth and Detachment. Water Sci. Technol. 2007; 55(8-9):247-255.
- 6) Alvarez G, González M, Isabal S, Blanc V, León R. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. AMB Express. 2013 Jan 4; 3(1):1.
- 7) AMUCHINA ® (Solución) Antiséptico. Laboratorios Pisa, S.A. de C.V. 2018. Disponible en: <https://www.medicamentos.com.mx/DocHTM/21081.htm>

- 8) ANMAT 2014. Análisis microbiológico de los alimentos metodología analítica oficial microorganismos indicadores volumen 3. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf
- 9) ANMAT Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos 2018. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf
- 10) ANMAT. Enfermedades transmitidas por alimentos. Ficha técnica n°8: síndrome urémico hemolítico. 2011. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/ficha_enfermedades_alimentos_SUH.pdf
- 11) ANMAT. Enfermedades transmitidas por alimentos. Ficha técnica n°9: Salmonelosis. 2018. Disponible en:
<http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/salmonelosis.pdf>
- 12) ANMAT. Guía de Inspección. Procedimiento de inspección, toma de muestra y protocolo de análisis para el control de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en locales de expendio de comidas preparadas. 2003. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/Guia_inspeccion_e_coli.pdf
- 13) ANMAT. Listado de aguas Lavandinas. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/listados/Listado_Aguas_Lavandinas_2017.pdf

- 14) ANMAT. Listado de Desinfectantes de superficies. Venta Profesional Actualizado al 27/04/2017. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/listados/Listado_Desinfectantes_Superficies_VP_17.pdf
- 15) ANMAT. Metodología Analítica Oficial Microorganismos Patógenos Volumen 1 (2011). Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf
- 16) APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21sted. Washington, DC, New York: American Public Health Association; 2005.
- 17) Azeredo J, Azevedo N, Briandet R, Cerca N, Coenye T., Costa A. Critical review on biofilm methods. Crit. Rev. Microbiol. 2017. 43 313–351.
- 18) Azeredo N, Vieira M, Keevil C. Establishment of a continuous model system to study *Helicobacter pylori* survival in potable water biofilms. Water Sci Technol 2003. 47:155–60
- 19) Barreto M, Castillo-Ruiz M, Retamal P. *Salmonella* entérica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. Revista chilena de infectología. Rev. chil. infectol. vol.33 no.5 Santiago oct. 2016
- 20) Beauchamp C, Dourou D, Geornaras I, Yoon Y, Scanga JA, Belk K, Smith G, Nychas G, Sofos J. Transfer, attachment, and formation of biofilms by *Escherichia coli* O157:H7 on meat-contact

- surface materials. J Food Sci. 2012. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22582718>
- 21) Benassatti H, Marfil L, Occhionero M. Ácido acético: su capacidad desinfectante. Acta bioquím. clín. latinoam; 28(3):411-9, 1994.
- 22) Boletín Integrado de Vigilancia N° 404 – SE 12 – Marzo de 2018. Ministerio de Salud de la Nación. Disponible en:
<http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/boletin-vigilancia-404-23-3-2018.pdf>
- 23) Bonsaglia E, Silva N, Fernades Júnior A, Araújo Júnior F, Tsunemib M, Rall V. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures Food Control. Volume 35, Issue 1, January 2014, Pages 386-391
- 24) Borges, K. Capacidade de produção de biofilme por cepas de diferentes sorovares de *Salmonella* em quatro temperaturas de incubação. Pesq. Vet. Bras. [online]. 2018, vol.38, n.1, pp.71-76.
- 25) Boulangé-Petermann L, Rault J, Bellon-Fontaine M Adhesion of streptococcus thermophilus to stainless steel with different surface topography and roughness. Biofouling. 1997. The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research. Disponible en:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927019709378331>
- 26) Boyd CD, Smith TJ, El-Kirat-Chatel S. Structural features of the *Pseudomonas fluorescens* biofilm adhesin LapA required for LapG-dependent cleavage, biofilm formation, and cell surface localization. J Bacteriol 2014. 196:2775–88.

- 27) Boyd R, Verran J, Jones M, Bhakoo M (2002) Use of Atomic Force Microscope to determine the effect of substratum surface topography on bacterial adhesion. *Langmuir* 18: 2343-2346. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la011142p>
- 28) Brusa V. Desarrollo y validación intralaboratorio de una metodología para la detección y aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina shiga en carne bovina molida. Desarrollo de estrategias de control. Tesis Doctoral. 2015. Disponible en: sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/51374/Documento_completo.pdf?
- 29) Cabrera J. “Criterios Microbiológicos Para Alimentos Código Alimentario Argentino Y Sus Últimas Actualizaciones”. 2013. Disponible en: http://www.aam.org.ar/src/img_up/21072014.4.pdf
- 30) Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993. 75, pp: 499 511
- 31) Carranza L, Rubio Lozano M, Méndez Medina R, Wachter Rodarte M, Núñez Espinosa, Velázquez Camacho, Freitas Macedo. Acetic acid as an intervention strategy to decontaminate beef carcasses in mexican commercial slaughterhouse. *Food Sci. Technol (Campinas)* vol.33 no.3 Campinas. 2013
- 32) Carrasco J, Signorini Porchieto M, Díaz García R, Ordóñez Méndez L. Evaluación de Riesgos en Alimentos, Impreso por Maynez Editores, Cerro de San Andrés # 260 Int. 102, Campestre

Churubusco, C.P. 04200 Coyoacán, México, D.F. ISBN: 978-607-00-1385-0. 2009. Disponible en: <https://ilsa.org/mexico/wp-content/uploads/sites/29/2017/08/ILSI-Mexico-Evaluacion-de-riesgos-en-alimentos.pdf>

- 33) CBE (Center for Biofilm Engineering). Biofilm basics: Section 1. Montana State University. 2018. Disponible en: http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html
- 34) CDC (Center of Diseases Control) Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities (2008). Disponible en: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/disinfection-methods/chemical.html>
- 35) CDC I. Disinfection and Sterilization. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities (2008). Disponible en: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/index.html>
- 36) CDC II. Chemical Disinfectants. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities (2008). Disponible en: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/disinfection-methods/chemical.html>
- 37) CDC. Diagnosis and Management of Foodborne Illnesses. 2001. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5002a1.htm>

- 38) Cerca F, Trigo G, Correia A. SYBR green as a fluorescent probe to evaluate the biofilm physiological state of *Staphylococcus epidermidis*, using flow cytometry. *Can J Microbiol* 2011. 57:850–6.
- 39) Chang L. 6° Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CICTA 6, Cuba. 1998.
- 40) Characklis W Attached microbial growths--I. Attachment and growth, *Water Research* 7, 1113-1127. 5. 1973.
- 41) Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine M, Hebraud M. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Feb; 68(2):728-37.
- 42) Chmielewski R, Frank J. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Vol. 2, 2003. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>
- 43) Christensen G, Simpson W, Bisno A, Beachey E. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces, *Infect Immun* 37, 318-326. 1982. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6179880>
- 44) Christensen G, Simpson W, Younger J. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative

model for the adherence of staphylococci to medical devices. 1985.
J Clin Microbiol 22:996–1006

- 45) Circular 4176: Documento De Orientacion Sobre La Aplicación De Determinadas Disposiciones Del Reglamento (CE) 2073/2005 Relativo A Los Criterios Microbiologicos Aplicables En Productos. SENASA 6 de febrero 2015. Disponible en: www.dipoa@senasa.gov.ar
- 46) CODEX Alimentarius. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Roma 2000. Disponible en: http://www.fao.org/tempref/codex/Reports/Alinorm10/al33_13s.pdf
- 47) Coll Cárdenas F. Modelado matemático del desarrollo microbiano en carnes bovinas. Tesis De Doctorado. 2005. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de La Plata. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/1570>
- 48) Comunidad Económica Europea. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Decisión De La Comisión de 8 de junio de 2001. L 165/48. Disponible en: http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/decision_ue_control_higiene.pdf
- 49) Conca C, Cumsille P. Modelamiento Matemático de Biofilms. 2007. Disponible en: http://www.dim.uchile.cl/~cconca/Workshop%20ICDB%2014-15:VI:2007/re%F1aca%2014-15:junio:2007/biofilm_model.pdf

- 50) Copes J, Pellicer K, Malvestiti L, Stanchi N. Sobrevivencia en tablas de cocina de madera y plástico inoculadas experimentalmente con *Listeria monocytogenes*. 2000. *Analecta Veterinaria*. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11119/039_VE20n2_copes_Listeria_tablas_cocina.pdf?sequence=1
- 51) Copes J, Pellicer K, Malvestiti L, Stanchi. Sobrevivencia en tablas de cocina de madera y plástico inoculadas experimentalmente con *Listeria monocytogenes*. *Analecta Veterinaria* 2000; 20, 2: 47-50.
- 52) Copes J. Estudio de nuevas alternativas tecnológicas que permitan incrementar la vida útil del pejerrey de laguna (*Odontheistes bonaerensis*). Tesis de maestría. 2005. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2598>
- 53) Copes J, Pellicer K, Hoyo G, López Cabrera M, Estigarribia M, Pineda Olmedo G, Loup V, Florentin C, Alonso M, Cardozo Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de hamburguesas en Paraguay. 2009. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11231>
- 54) Costerton J, Cheng K, Geesey G, Ladd T, Nickel J, Dasgupta M, Marrie T Bacterial biofilms in nature and disease, *Annu Rev Microbiol* 41, 435-464. 1987.
- 55) Costerton J, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999. 284, pp: 1318-1322.

- 56) Costerton J. Introduction to biofilm. Int J Antimicrob Agents.1999 May; 11(3-4):217-21. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10394973>
- 57) Cumsille P, Asenjoc J, Conca C. A novel model for biofilm growth and its resolution by using the hybrid immersed interface-level set method. Computers and Mathematics with Applications 67 (2014) 34–51.
- 58) Dalton H, Goodman A, Marshall K. Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 17, 228-234. 29.1996.
- 59) Dantas Espadas V, Morales Capelo A, Martínez Barrio M. Supervivencia patógenos en superficies de acero inoxidable en extractos vegetales. XXIII Jornadas Nacionales De Seguridad Alimentaria. Adeje (Tenerife) 7, 8 y 9 de Mayo 2014. <http://www.jornadasavesa.com/index.php/navarra/itemlist/category/137-jornadas-tenerife>
- 60) De los Santos Villamil A, Hernández Anguiano A, Eslava Campos C, Landa Salgado P, Mora Aguilera G, Luchansky J. Producción de biopelículas y resistencia a desinfectantes en cepas de *Salmonella* aisladas de nopal, agua y suelo. Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.3 no.6 Texcoco. 2012.
- 61) Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D'Orio V, Vergara A, Conter M, Lanieri A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces:

- relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol.* 2008 Jun; 104(6):1552-61.
- 62) Di Conza J, Power P, Gutkind G. Intercambio de mecanismos de resistencia entre bacterias gram negativas. *Revista Farmacéutica Reviews*; Año: 2013 vol. 155 p. 57 - 69
- 63) Di Rienzo J, Balzarini M, Gonzalez L, Casanoves F, Tablada M. InfoStat es un software para análisis estadístico de aplicación general desarrollado bajo la plataforma Windows.2018. Disponible en: <https://www.infostat.com.ar/>
- 64) Diaz C. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. 2011. Tesis de doctorado. Sedici. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/2685>
- 65) Directiva 471/2001. Normas para los controles regulares de la higiene realizados por explotadores de establecimientos. Disponible en: <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/99e23ed5-0cac-44f0-adc5-a511f22c83f9/language-es>
- 66) Dominguez-Benetton X, Seveda S, Vanbroekhoven K, Pant D. The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems. *Chemical Society Reviews.* Issue 21, 2012.
- 67) Donlan R. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sep; 8(9):881-90.

- 68) Dourou D, Beauchamp C, Yoon Y, Geornaras I, Belk K, Smith G, Nychas G, Sofos J. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology*. Disponible en: <http://europemc.org/abstract/med/21802758>
- 69) Dufrene YF. (2002). Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol* 184:5205–13.
- 70) Durán H. Soluciones de superoxidación y su evolución tecnológica. *Revista Dolor, Foro Nacional de Investigación y Clínica Médica, Año 7 (Vol. III): 4-8. 2010. Disponible en: <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=64688>*
- 71) Eberl H, Parker D, van Loosdrecht M. A New Deterministic Spatio-Temporal Continuum Model For Biofilm Development, *J. Theor. Med*, 3(3), 2001.
- 72) ETA “Curso de Epidemiología y Control de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA)” Abril-septiembre de 2018. Instituto R. Jara INE-ANLIS. Mar del Plata, Argentina.
- 73) Faleiro Naves P. Formación de biopelículas por “*Escherichia coli*” y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis doctoral. Madrid 2010. ISBN: 978-84-692-8575-6. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf>

- 74) FAO. Código Internacional Recomendado De Prácticas - Principios Generales De Higiene De Los Alimentos. 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/y1579s/y1579s02.htm#bm2.7>.
- 75) FAO. Código internacional recomendado de prácticas - principios generales de higiene de los alimentos. Codex Alimentarius - Higiene de los Alimentos - Textos Básicos - Segunda Edición. Rev. 3. 1997. Disponible en: <http://www.fao.org/3/y1579s/y1579s02.htm>
- 76) FAO. Manual de Inspección de Alimentos basada en el riesgo. 2008. Disponible en: <http://www.fao.org/3/i0096s/i0096s00.htm>
- 77) FAO. Prevención de la *E. coli* en alimentos. 2018. [http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing Ecolis.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecolis.pdf)
- 78) FAO-OMS. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/3/l9553ES/l9553es.pdf>
- 79) FDA- BAM. Microbiological Methods & Bacteriological Analytical Manual. 2002. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/microbiological-methods-bacteriological-analytical-manual-bam>
- 80) FDA. SCOGS (Select Committee on GRAS Substances). 2018. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-substances-scogs-database>
- 81) FDA: Bad Bug Book (Second Edition) Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. 2012. Disponible

en: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition>

- 82) Flemming H, Neu T, Wozniak D. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J Bacteriol.* 2007 Nov; 189(22): 7945–7947. 2007.
- 83) Fletcher M. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. 1977. *Can J Microbiol* 23:1–6.
- 84) Flores Encarnación M, Aguilar Gutiérrez R, Cabrera Maldonado C, Guzmán Flores J, Flores-Encarnación M. El impacto biológico de los autoinductores bacterianos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* v.31 n.2 Caracas dic. 2011.
- 85) Forrest B, Hopkins G, Dodgshun T, Gardner J. Efficacy of acetic acid treatments in the management of marine biofouling. *Aquaculture* 262(2-4):319-332. 2007.
- 86) Fuqua W, Winans E, Greenberg P. Minireview Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *Journal Of Bacteriology.* 1994, p. 269-275 Vol. 176, No. 2. Disponible en: <http://jb.asm.org/content/176/2/269>
- 87) Fuster i Valls N. Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. 2006. Disponible en: <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/5683/nfv1de1.pdf?sequence=1>.

- 88) Garçao Curiao T. Análisis fenotípico, genómico y bioinformático de los elementos genéticos asociados a resistencia a antibióticos y biocidas en enterobacterias. Tesis doctoral.2014. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/24967/>
- 89) Garret T, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*. 2008; 18:1049-1056.
- 90) Ghigo J. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development, *Nature* 412, 442-445. 104. 2001.
- 91) Giannuzzi L, Pinotti A, Zaritzky N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. 1998. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 101 – 110
- 92) Giannuzzi L, Zaritzky N. The effect of Packaging Film on the shelf - life of treated refrigerated pre - peeled potatoes. *Packaging Technology and science*. 1991. Vol 4, Issue 2, 69 -76.
- 93) Gibson A, Roberts T. Predicting microbial growth: Development of a mathematical model to predict bacterial growth responses. 1989. *Food Australia*, 41, 1075 - 1079.
- 94) Gill C, et al. Evaluation of the hygienic performances of the processes for cleaning, dressing and cooling pig carcasses at eight packing plants. *Int J Food Microbiol*. 58, 65–72 (2000).
- 95) Gómez J, Gómez-Lus M, Bas P, Ramos C, Cafini F, Maestre F, Prieto J. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador

- en la patogenia de bacilos gramnegativos? Rev Esp Quimioter 2013;26(2):97-102.
- 96) González-Fandos E, Herrera B. Efficacy of acetic acid against *Listeria monocytogenes* attached in poultry skin during refrigerated storage. Foods. 3, 527-540. 2014. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5302253/>
- 97) Gunduz G, Tuncel G. Biofilm formation in an ice cream plant. Antonie Van Leeuwenhoek. 2006; 89(3-4):329-36. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16779628>
- 98) Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. Curr Opin Biotechnol. 2002 Jun; 13(3):228-33.
- 99) Harshey R. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal, Annu Rev Microbiol 57, 249-273. 2003.
- 100) Hernández Puga, C. Simulación y control de biofilms portadores de "*Listeria monocytogenes*" en la industria alimentaria. Tesis Doctoral. 2016. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/38812/>
- 101) Huang Y, Hung Y, Hsu S, Huang Y, Hwang D. Application of electrolyzed water in the food industry. Food Control, 19: 329-345. 2008.
- 102) ICMSF (2002) Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Kluwer Academic/Plenum Publishers. E.U. ISBN 978-1-4613-5221-1
- 103) Instituto de Salud Pública. Gobierno de Chile. Procedimiento Recuento De Microorganismos En Suspensión Por Metodo De

- Torunda En Superficie. 2008. Disponible en:
<https://vdocuments.net/torundas.html>
- 104) Iso 22000. Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos – Requisitos para cualquier organización en la cadena alimentaria. 2005. Disponible en:
http://marcelrzmur.com.mx/SistemasCalidadAlimentos/iso22000_2005.pdf
- 105) Jass J, Surman S, Walker J. Medical Biofilms: Detection, Prevention and Control, Volume 2. P 200. ISBN 047198867. 2003. Disponible en: <https://www.wiley.com/en-us/Medical+Biofilms%3A+Detection%2C+Prevention+and+Control-p-9780471988670>
- 106) Jay J. Microbiología moderna de los alimentos. ISBM 978-84-200-1125-7. Editorial Acribia. 2009.
- 107) Jeong D, Frank J. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in Biofilms with Microorganisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments. Journal of Food Protection: July 1994, Vol. 57, No. 7, pp. 576-586.
- 108) Jiménez Martínez F. El filtro de cocina: como factor de riesgo en la contaminación cruzada de los alimentos. REDVET Revista electrónica de Veterinaria 2014 Volumen 15 N° 05 Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050514.html>

- 109) Kahrs R. Principios generales de la desinfección. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 1995,14 (1), 143-163. Disponible en: <https://www.oie.int/doc/ged/D8972.PDF>
- 110) Kaiser D. Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns Curr Biol. 2007 Jul 17; 17(14):R561-70.
- 111) Katsikogianni M, Missirlis M. Concise Review Of Mechanisms Of Bacterial Adhesion To Biomaterials And Of Techniques Used In Estimating Bacteriamaterial Interactions. European Cells and Materials Vol. 8. 2004 (pages 37-57). Disponible en: <http://www.ecmjournal.org/papers/vol008/pdf/v008a05.pdf>
- 112) Keskinen L, Todd E, Ryser E. Transfer of Surface Dried *Listeria monocytogenes* from Stainless Steel Knife Blades to Roast Turkey Breast. Journal of Food Protection 71, pp: 176 181. (2008).
- 113) Klein M, Stacy Gregoire K, Rosalen P, Hyun Koo. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. Mol Oral Microbiol. 2012 Oct; 27(5): 350–361.
- 114) Kotra LP, Amro NA, Liu GY, Mobashery S. Visualizing bacteria at high resolution. 2000. ASM News 66:675–81.
- 115) Kusumaningrum H, Riboldi G, Hazeleger W, Beumer R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. Int J Food Microbiol. 2003 Aug 25;

85(3):227-36.

Disponible

en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878381>

- 116) Lantagne D, Preston K, Blanton E, Kotlarz N. Hypochlorite Solution Expiry and Stability in Household Water Treatment in Developing Countries. *Journal of Environmental Engineering* 137(2)-January 2010.
- 117) Lawrence J, Swerhone G, Neu T. A simple rotating annular reactor for replicated biofilm studies. *J Microbiol Methods* 2000. 42:215–24.
- 118) Lazdunski A, Ventre I, Sturgies J. Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2:581-591.
- 119) Leotta G, Copes J. Programa de Carnicerías Saludables. LUSUH (Asociación Lucha contra el Síndrome Uremico Hemolítico) Boletín de Actualización. 2011. Disponible en: http://www.lusuh.org.ar/lusuh_boletin_21_A.pdf
- 120) Li L, Mendis N, Triguí H. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 5:258. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/263015534_The_importance_of_the_viable_but_non-culturable_state_in_human_bacterial_pathogens

- 121) Lianou A, Koutsoumanis KP. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. 2012. Int. J. Food Microbiol. 160:171-178.
- 122) Linton A, Matyas Z, Koulikovskii A. World Health Organization. Veterinary Public Health Unit. (1983). Guidelines on prevention and control of salmonellosis / edited by A. H .Linton; coordinated by Z. Matyas and A. Koulikovskii. World Health Organization. <https://apP.who.int/iris/handle/10665/66402>
- 123) López Aguayo M, Grande Burgos M, Lucas López R, Gálvez A. Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, Vol. 23, 2010, págs. 121-136
- 124) López Núñez A. Contributions to mathematical modelling and numerical simulation of biofilms. Tesis doctoral Universidade da Coruña (España) en 2018. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=150647>
- 125) Luo H, Wan K, Wang H. High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAMBeta1 transmission by *Lactococcus lactis*, Appl Environ Microbiol 71, 2970-2978. 105. 2005.
- 126) Mafu A, Roy D, Goulet J, Savoie L, Roy R. Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces, J Dairy Sci 73, 3428-3432.

- (1990). Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2129169>
- 127) March Rosselló G, Eiros Bouza J. Quorum sensing en bacterias y levaduras. Volume 141, Issue 8,19 October 2013, Pages 353-357
- 128) Márquez Lara, D. Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. Ciencia y Tecnología Agropecuaria 2008, 9. ISSN 0122-8706 Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945024014>>
- 129) Marsh P. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. J Clin Periodontol. 2005; 32 Suppl 6:7-15.
- 130) Martínez Díaz Y. “Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas como indicativo de la actividad antifouling de compuestos de origen natural.” Tesis presentada como requisito para recibir el título de Magíster en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. 2010. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/5100/1/186295.2011.pdf>
- 131) Mazengia E, Fisk C, Liao G, Huang H, Meschke J. Direct Observational Study of the Risk of Cross-contamination during Raw Poultry Handling: Practices in Private Homes. Food Protection Trends, Vol 35, No. 1, p.8–23. 2015. Disponible en: <http://www.foodprotection.org/files/food-protection-trends/JAN-FEB-15-mazengia.pdf>

- 132) Mazzitelli J. Desinfección ecológica. Aguas electroactivadas, la evolución inteligente. 2013. Producir XXI, Bs. As., 21(259):26-28. Sitio argentino de Producción Animal. www.produccion-animal.com.ar. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/agua_cono_sur_de_america/60-aguas_electroactivadas.pdf
- 133) McGuire J, Swartzel K. The influence of solid surface energetics on macromolecular adsorption from milk 1. Volume13, Issue2. April 1989. Pages 145-160
- 134) McLean R, Pierson L, Fuqua C. Simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. J Microbiol Methods. 2004; 58(3):351-360.
- 135) Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. International Biodeterioration & Biodegradation. Volume 51, Issue 4, June 2003, Pages 249-253
- 136) Ministerio de Agroindustria, SENASA. Resolución 336/2016. Disponible en:http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/normativas/archivos/r_senasa_336-2016.pdf
- 137) Moltz A, Martin S. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. J Food Prot. 2005 Jan;68(1):92-7.
- 138) Moredo, F. Prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénico y *Escherichia coli* productor de toxina shiga en cerdos sin

manifestación clínica de diarrea de la provincia de Buenos Aires. Tesis de Doctorado. Sedici. 2012. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/20352>

- 139) Mossel D, Moreno García, Struijk B, Corry B. Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos. Zaragoza Acribia. 2003. xxx , 703 p. : 27 cm. Edición ; 2 ed. ISBN 8420009989.
- 140) Myszka K, Czaczyk K. Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces a Review 2011. Disponible en: http://journal.pan.olsztyn.pl/pdfy/2011/3/10222_Volume61_Issue3_02_paper.pdf
- 141) Navia D, Villada H, Mosquera S. Las Biopelículas En La Industria De Alimentos. Rev.Bio.Agro vol.8 no.2Popayá 2010. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-3561201000020001
- 142) Neilson K. Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. Arch Microbiol.1977 Feb 4; 112(1):73-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/843170>
- 143) Neu T, Lawrence J. Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. Adv Biochem Eng Biotechnol 2014b 146:1–51.

- 144) OIE. Una sola salud. 2019. Disponible en:
<http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/una-sola-salud/>
- 145) OMS. 8th Report 1999–2000. Surveillance Program for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 2003. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322063/>
- 146) OMS. Establecimiento: mantenimiento, limpieza y desinfección. Inocuidad de los Alimentos - Buenas Prácticas. 2016. Disponible en:
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10822%3A2015-establecimiento-mantenimiento-limpieza-desinfeccion&catid=7677%3Abpabpm&Itemid=42210&lang=es
- 147) OMS. Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Transmisión Alimentaria (FERG). Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. 2015. Disponible en:
https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/ferg-report/es
- 148) OPS. Auditoría de las BPA/BPM y del plan HACCP 2015. Disponible en:
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=7630&Itemid=40906&lang=es
- 149) OPS. Establecimiento: mantenimiento, limpieza y desinfección. Consultado 2018. Disponible en:

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10822:2015-establecimiento-mantenimiento-limpieza-desinfeccion&Itemid=42210&lang=es

- 150) OPS. Principio VI: Establecer procedimientos de verificación del plan HACCP. 2017. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10919:2015-principio-vi-establecer-verificacion-haccp&Itemid=41432&lang=es
- 151) OPS-OMS. Educación en inocuidad de alimentos: Glosario de términos. 2016. Disponible en https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10433%3Aeducacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-de-alimentos&catid=1237%3Aeducation-on-food-safety&Itemid=41278&lang=es
- 152) O'Toole G, Kolter R. Iniciación of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 1998 May; 28(3):449-61. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632250>
- 153) Paz-Méndez A, Lamas A, Vázquez B, Miranda J, Cepeda A, Franco C. Effect of Food Residues in Biofilm Formation on Stainless Steel and Polystyrene Surfaces by *Salmonella enterica* Strains Isolated from Poultry Houses. *Foods.* 2017 Nov 29;6(12).

- 154) Paz-Méndez A, Lamas A, Vázquez B, Miranda J, Cepeda, Franco C. Effect of Food Residues in Biofilm Formation on Stainless Steel and Polystyrene Surfaces by *Salmonella enterica* Strains Isolated from Poultry Houses. *Foods*. 2017; 6(12). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29186017>
- 155) Peeters E, Nelis H, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008 Feb; 72(2):157-65. Epub 2007 Nov 21.
- 156) Peeters E, Nelis H, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008 Feb;72(2):157-65.
- 157) Pellicer K, Copes J, Giannuzzi L y Zaritzky N. Behavior of *Listeria monocytogenes* type1 355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. *Food Control* 22: 1573-1581. 2011.
- 158) Pennimpe M. Guía Orientadora para la Implementación del HACCP. Circular 3579. 2003. Disponible en: <http://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2014/06/Gu%C3%ADa-Orientadora-SENASA-HACCP.pdf>
- 159) Peña, S. Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria. 2010. Disponible en:

<https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>

- 160) Piera Serra G. Estudio de biofilms: Formación y consecuencia. 2003. Disponible en: http://www.quiveter.com/ftp_public/A1070308.pdf
- 161) Pipek P, Markeřta S, řikulov A, Jeleniřkova J, Masatoshi Izumimoto B. Colour changes after carcasses decontamination by steam and lactic acid Meat Science 69 (2005) 673–680 Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.540.4005&rep=rep1&type=pdf>
- 162) Pipek P, Milan Houska, Jelenikova J, Kyos K. Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray, En: Journal of Food Engineering 67, 2005, p. 309–315.
- 163) Pires S, Evers E, van Pelt W, Ayers T, Scallan E, Angulo F, Havelaar A, Hald T. Attributing the human disease burden of foodborne infections to specific sources. Foodborne Pathog Dis. 2009 May; 6(4):417-24.2008.
- 164) Quimicas.net. "Ejemplos de ácidos Orgánicos". 2018 Disponible en: <http://www.quimicas.net/2015/05/ejemplos-de-acidos-organicos.html>

- 165) Quirynen M, Marechal M, Busscher H: The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. *J Clin periodontol.* 1990; 17: 138-44.
- 166) REGLAMENTO (CE) no 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 2015. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/es/TXT/?uri=CELEX%3A32005R2073>
- 167) Reid C, Koppmann M, Santín C, Feldman P, Kleiman E, Teisaire C. Guía de buenas prácticas de manufactura para servicios de comidas. 2011. http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/publicaciones/calidad/bpm/bpm_serviciocomida_2011.pdf
- 168) Repetto H, Long-term course and mechanisms of progression of renal disease in hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl*, 2005. 68:S102-6.
- 169) RESOLUCIÓN MERCOSUR GMC 80/96, 2006. Disponible en: https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/34541/177140/file/GMC%2080_96.pdf
- 170) Rios Castillo A. Evaluación del nivel de contaminación de superficies y la eficacia de productos desinfectantes a corto y largo plazo: nuevos métodos. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de

Barcelona. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. 2014.

Disponible en: <https://ddd.uab.cat/record/116383>

- 171) Rodríguez R. "Calidad Integral de Alimentos y Ecología Microbiana". 2006. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29129/Documento_completo.pdf?sequence=1
- 172) Rodríguez R. "Calidad Integral de Alimentos y Ecología Microbiana". 2016. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29129/Documento_completo.pdf?sequence=1
- 173) Rosen M, Kunjappu J, Surfactants and Interfacial Phenomena. 2012. (4th edición). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. P.1. ISBN 1-118-22902-9. Disponible en: https://books.google.com.ar/books?id=1rCdNlzb78AC&printsec=frontcover&redir_esc=y&hl=es-419#v=onepage&q&f=false
- 174) Ruiz-Bolivar Z, Poutou-Piñales R, Carrascal-Camacho A. Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. NOVA [Internet]. 31dic.2008; 6(10). Disponible en: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/120>
- 175) Rutala W, Weber D. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) 3. Disponible en: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines.pdf>

- 176) Rutala W, Weber D. Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, 1997, p. 597–610 Vol. 10, No. 4 Copyright 1997.
- 177) Ryu J, Beuchat L. Biofilm formation by Escherichia coli O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. Appl Environ Microbiol. 2005. Jan;71(1):247-54.
- 178) Ryu J, Kim H, Frank J, Beuchat LR. Attachment and biofilm formation on stainless steel by Escherichia coli O157:H7 as affected by curli production. Lett Appl Microbiol. 2004; 39(4):359-62.
- 179) SAG. Ministerio de Agricultura, Chile. Preparacion y manejo de desinfectantes químicos y físicos. 2018. Disponible en: http://www.sag.cl/sites/default/files/l_preparacion_manejo_desinfectantes_FA.pdf
- 180) Sattar S. Limpieza, desinfección y esterilización. 2014. http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/Disinfection_. Disponible en: http://theific.org/wp-content/uploads/2014/08/Spanish_ch12_PRESS.pdf
- 181) Schneider R, Marshall K. Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2, 387-396. 1994. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777659480002>

2

182) SENASA. Manual de procedimientos de desinfección. 2016.

<https://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=920&io=394>

8

183) Shank EA, Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling. *Curr Opin Microbiol.* 2009; 12:205-14. EA, Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling. *Curr Opin Microbiol.* 2009; 12:205-14.

184) Sharma M, Anand S. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology* Volume 19, Issue 6, December 2002, Pages 627-636

185) Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* Vol 20, Issue 9, 2009, Pages 407-413. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224409000557>

186) Silagyi K. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. 2007. Disponible en: <http://www.lib.umd.edu/drum/bitstream/1903/7806/1/umi-umd-5089.pdf>

187) Silva A, Zotta M, Uez O. Epidemiología de las ETA. "Curso de Epidemiología y Control de las Enfermedades Transmitidas por

Alimentos (ETA)” Abril-septiembre de 2017. Aprobado. Instituto R. Jara INE-ANLIS. Mar del Plata, Argentina

- 188) Silva D, Celidonio F, Oliveira K. Verificação da temperatura de refrigeradores domésticos para minimizar a deterioração e possíveis doenças veiculadas por alimentos. 2008. Revta Hig. Aliment. 22:42-45.
- 189) Sim S, Suwarno S, Chong T. Monitoring membrane biofouling via ultrasonic time-domain reflectometry enhanced by silica dosing. J Membrane Sci 2013. 428:24–37
- 190) Singh P, Parsek M., Greenberg E, Welsh M. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development, Nature 417, 552-555. 92. 2002.
- 191) Siryaporn A, Kuchma S, O'Toole G, Gitai Z. Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Proc Natl Acad Sci U S A. v.111 (47); 2014. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4250119/>
- 192) Solberg M, Brunswick N, Buckalew J, Chen C; Schaffner D. Microbiological safety assurance system for foodservice facilities 1990. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9123571>
- 193) Sonja Koukel. Selection and Use of Home Cleaning Products College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, New Mexico State University. Disponible en: https://aces.nmsu.edu/pubs/_g/G304/welcome.html

- 194) Stevens R, Holah J. The effect of wiping and spray-wash temperature on bacterial retention on abraded domestic sink surfaces *Journal of Applied Bacteriology* 1993, 75, 91-94. Disponible en: https://www.nickelinstitute.org/~media/Files/TechnicalLiterature/EffectOfWipingAndSprayWashTemperatureOnBacterialRetentionOfAbradedDomesticSink_10069.ashx
- 195) Stoodley P, Sauer K, Davies D, Costerton J. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.*2002; 56:187-209. Epub 2002.
- 196) Tabernero de Paz M, Bodas R, Bartolomé D, Posado R, García J, Olmedo S. Agua electrolizada como higienizante en producción animal: efectos en sanidad y productividad. *Arch. Zootec.* 62 (R): 13-23. 2013. Disponible en: http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/03_11_00_2706REVISIONAguasTabernero.pdf
- 197) Talero García M. Utilización de aceites esenciales en combinación con ácido láctico para extender la vida útil de carnes bovinas. Tesis de Maestría. 2019. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/74952/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 198) Téllez S. Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria. *Revista VISAVET Divulgación.* 2010. Disponible en:

<https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>

- 199) Thomas J, Nakaishi L. Managing the complexity of a dynamic biofilm, *J Am Dent Assoc* 137 Suppl, 10S-15S. 2006.
- 200) Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C., Molin, S. (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. *J Bacteriol* 182, 6482-6489.
- 201) Trulear M, Characklis W. Dynamics of Biofilm Processes. *Water Pollution Control Federation* 54(9) September 1982
- 202) Valdés Duque B. Aplicación de diferentes técnicas analíticas para evaluar la contaminación fúngica de alimentos y superficies (Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Ciència Animal i dels Aliments) 2008. Disponible en: <https://ddd.uab.cat/record/38483>
- 203) Van Houdt R, Michiels C. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology* vol 109,4:1117-1131. 2010.
- 204) Vanhaecke E, Remon J, Moors, Raes, De Rudder, Van Peteghem A. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity, *Appl Environ Microbiol* 56, 788- 795. 1990. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183422/>
- 205) Varin K, Lin N, Cohen Y. Biofouling and cleaning effectiveness of surface nanostructured reverse osmosis

membranes. Journal of Membrane Science 446:472-481.

November 2013

- 206) Verwey, E. J. W. (1948) Theory of the Stability of Lyophobic Colloids, Elsevier, New York. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pol.1949.120040321>
- 207) Villanueva D, Salazar M. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh cheese of markets in Cercado de Lima. An. Fac. med. [online]. 2017, vol.78, n.3, pp.322-325.
- 208) Walker S, Hill J, Redman J, Elimelech, M. Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g, Appl Environ Microbiol 71, 3093-3099. 2005.
- 209) Wang R, Bono J, Kalchayanand N, Shackelford S, Harhay D. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food-processing environment. J Food Prot. 2012 Aug; 75(8):1418-28. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22856565>
- 210) Wang R, Kalchayanand N, Schmidt J, Harhay D. Mixed biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium enhanced bacterial resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances. J Food Prot. 2012 Aug;75(8):1418-28. www.nature.com/scientificreports

- 211) Waters C, Bassler B. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2005. Vol. 21:319-346
- 212) Whitehead K, Colligon J, Verran J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. Colloids Surf B Biointerfaces. 2005. Mar 25; 41(2-3):129-38.
- 213) Whiting R. Microbial Modelling in Foods. 1995. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 35, 6, 467-494.
- 214) Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M. Look whos talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2007; 362: 1119-34.
- 215) Xinzhe Gu, Ye Sun, Kang Tu, Qingli Dong, Leiqing Pan. Predicting the growth situation of *Pseudomonas aeruginosa* on agar plates and meat stuffs using gas sensors. Scientific Reports 2016. Disponible en: www.nature.com/scientificreports
- 216) Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L, Deng Y. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. Curr Microbiol. 2016 Oct; 73(4):474-82.
- 217) Yusibeska R, Alonso G. Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales. Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.31 n.2 Caracas 2011.
- 218) Zotta CM, Chinen I, Lavayén S, Cepeda M, Deza N, Morvay L, Carbonari C, Rearte A, Rivas M. Portación de *Escherichia coli* en

convivientes de casos de síndrome urémico hemolítico. *Salud i Ciencia* 21(2):136-41, Mar 2015.

- 219) Zwietering M, Jongenburger I, Rombouts F, Van't Riet K. Modelling of the bacterial growth curve. 1990. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875 – 1881