



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

TRABAJO INTEGRADOR FINAL
Carrera de Especialización en Seguridad
Alimentaria

***EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
PARA FORMAR BIOFILMS A 3°C DE
9 CEPAS DE
Listeria monocytogenes***

Autor: M.V. Real Diego German

Directora: M.V. Mg. Karina E. Pellicer

Co director: Dr. Julio Copes

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

CONTENIDO

Resumen.....	
1. Introducción	
1.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	
1.2 Listeriosis.....	
1.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	
1.3.1 Características filogenéticas.....	9
1.3.2 Patogenicidad de <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.3.3 Resistencia a desinfectantes	11
1.4 <i>Biofilms</i>	
2. Objetivo del trabajo	
3. Materiales y métodos	
3.1 Formación de <i>biofilms</i> sobre acero inoxidable.....	16
3.2. Toma de muestra y procesado de las superficies de AI incubadas con cada cepa ...	18
4. Resultados	
4.1. Formación de biofilms a 3°C durante 120 horas.....	22
4.2. Aplicación de la ecuación de Gompertz a los datos experimentales.....	27
5. Discusión	
5.1 Desarrollo de biopelículas	28
6. Bibliografía	

Resumen

Con el fin de evaluar la capacidad de formación de *biofilms* de nueve cepas de *Listeria monocytogenes* (aisladas de superficies de acero inoxidable en cámaras frigoríficas) a 3°C durante 120 horas, se realizaron los siguientes estudios. a) desarrollo de un bioensayo para evaluar la capacidad de formación de *biofilms* en acero inoxidable (AI). Para verificar la formación de *biofilms*, se hisoparon las superficies inoculadas, para un posterior recuento en placa. Se observó que El 55,5 % de las cepas analizadas poseen la capacidad de producir *biofilms*, en un lapso mínimo de incubación de 3 horas. Estadísticamente, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la comparación realizada entre las cepas 1508 y 1504. En las demás cepas no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

1. 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 según la *Food and Agriculture Organización* (FAO) Organización Mundial de la Salud (OMS 2018). La contaminación de dichos alimentos puede producirse en cualquiera de las etapas del proceso de fabricación o de distribución, aunque la responsabilidad recae principalmente en el productor. Un alto porcentaje de las enfermedades transmitidas por los

alimentos (ETA) son causadas por alimentos que han sido preparados o manipulados de forma incorrecta en los diferentes lugares de producción.

La capacidad intrínseca que posee *L. monocytogenes* de resistir en condiciones extrínsecas adversas, puede generar una gran capacidad de adaptación y crear estrategias de resistencia tales como la formación de biopelículas o *biofilms* aumentando la probabilidad de contaminación de dichos alimentos.

Desde el punto de vista de la higiene y la salud alimentaria y pública, *L. monocytogenes* es un organismo que se considera prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés *Hazard Analysis and Critical Control Points*) llevados a cabo en la industria alimentaria, como así también en los planes de prevención de enfermedades de las instituciones sanitarias (Mengoni y Apraiz, 2003; ILSI, 2005).

Debido a esto, es importante el desarrollo de sistemas experimentales que simulen efectivamente las condiciones del ambiente de procesamiento de alimentos, ya que dichos estudios pueden hacer una gran contribución al conocimiento de los factores que influyen en la formación de *biofilms* tanto de *L. monocytogenes* como de muchos otros patógenos transmitidos por los alimentos, y ayudar en la erradicación de los mismos mediante el desarrollo de estrategias de control efectivas para obtener un alimento inocuo. Colagiorgi y col., (2017) Tao y col., (2020)

1.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos.

La OMS define a las 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 desde el punto de vista de su patogenia 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 tóxicos o toxinas preformadas 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 micóticas.

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

Independientemente de cuál sea el origen de la ETA, las infecciones bacterianas causan aproximadamente 76 millones de casos en Estados Unidos cada año y generan un considerable costo económico. Los agentes etiológicos más comúnmente aislados a partir de los alimentos son: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella entérica*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum* tipo A, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* y *Clostridium perfringens* (Hernández Porras y col., 2017; Tao y col., (2020).

La rápida identificación del agente causal en los brotes de ETA, influye en forma determinante en el control de la enfermedad, disminuyendo de esta manera la morbi-mortalidad y las pérdidas económicas. Para su identificación en alimentos, los métodos microbiológicos convencionales son los más utilizados ya que se encuentran normalizados por entes internacionales (*International Organization for Standardization ISO*, *American Public Health Association APHA*, *Food and Drug Administration FDA*, etc.). Estos insumen gran cantidad de tiempo, siendo a veces de poca utilidad. En estos casos y en base a las normativas estandarizadas puede utilizarse métodos rápidos de diagnóstico.

Las técnicas diagnósticas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) y la reacción en cadena de la polimerasa de tipo múltiple, permiten mayor eficiencia, sensibilidad y rapidez en el tiempo de detección Elkin, E. (2017)

Recientemente Tao y col., (2020) lograron mediante PCR múltiple, la detección de 12 patógenos transmitidos por alimentos (incluyendo a *L. monocytogenes*) a partir de muestras de hisopos anales y soluciones de enriquecimiento de muestras de alimentos, utilizando cebadores específicos y sondas de hibridación marcadas con fluorescencia basadas en los genes de virulencia de los 12 patógenos en estudio.

1.2 Listeriosis.

La listeriosis es una ETA de origen infecciosa de carácter grave, pero de baja frecuencia que causa la muerte hasta en un 30% de los casos. Tiene un periodo de incubación que varía desde algunos días hasta tres meses. El número de células bacterianas que deben ingerirse para que se presente la ETA aún no está claramente definido, la FDA (2009) informó que la ingesta de hasta 100 células no afecta la salud de los consumidores sanos. En los grupos de riesgo, según Castro-Espinoza y col., (2009), la dosis infectiva mínima necesaria es de 10^4 células para producir enfermedad.

En el caso de las mujeres embarazadas, las cuales conforman uno de los grupos de riesgo más importantes, produce abortos, natimortos y nacimientos prematuros. En el caso de los pacientes inmunodeprimidos (tratamientos contra el cáncer, trasplantados, personas enfermas de sida y los ancianos) se presenta con un cuadro invasivo con infección sistémica, septicemia y encefalitis conduciendo a la muerte o en su defecto puede dejar secuelas neurológicas (Schöbitz y col., 2009). En

personas que no pertenecen a los grupos de riesgo, una infección de *L. monocytogenes* causa cuadros de gastroenteritis febriles leves similares a una gripe. El diagnóstico rápido y tratamiento temprano con antibióticos como ampicilina y aminoglucósidos o cotrimoxazol son efectivos. Sin embargo, la sintomatología generalmente no permite un diagnóstico temprano, ya que los primeros signos de un brote son generalmente el aborto o la muerte del individuo.

La confirmación de una infección por *L. monocytogenes* con sintomatología neurológica, se realiza mediante el aislamiento de la bacteria en el líquido cefalorraquídeo o la sangre del paciente (Schöbitz y col, 2009; Julián y col. 2001).

1.3 Listeria monocytogenes.

Listeria monocytogenes es un cocobacilo gram-positivo, móvil a 25°C e inmóvil a 37°C, capaz de sobrevivir a temperaturas extremas entre 1°C y 45°C con un óptimo desarrollo a 37°C. Se le considera un patógeno psicótropo, es decir capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración, lo cual la diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* spp., o *Staphylococcus aureus*, cuyo crecimiento se inhibe a bajas temperaturas. En cuanto al pH, desarrolla en un rango entre 4,4 y 9,4, crece en presencia en un 10% de NaCl y sobrevive a un 16 a 20% de NaCl. Es un microorganismo no esporulado, anaerobio facultativo, patógeno de origen alimentario en humanos y animales con una amplia distribución en la naturaleza. La transmisión a través de alimentos, en epidemias o en

casos esporádicos, en poblaciones inmunosuprimidas, constituyen los dos factores fundamentales para la presentación de la enfermedad.

La capacidad intrínseca de resistir en condiciones extrínsecas adversas, puede generar una gran capacidad de adaptación y crear estrategias de resistencia tales como la formación de biopelículas o *biofilms* (Kalmokoff y col, 2001). Esta capacidad es un problema grave para las empresas alimentarias por la dificultad que presenta su control en las plantas de procesado. (Kahrs, 1995; Brøndsted y col., 2003; Pan y col., 2006)

1.3.1 Características filogenéticas

En la última década, el género *Listeria* se ha expandido hasta incluir 18 especies con diversas características fenotípicas y genotípicas.

La caracterización de las últimas 10 especies descritas a partir del año 2009, han provisto un nuevo enfoque y dejan ver la necesidad de reevaluar la taxonomía del actual género *Listeria*.

Actualmente el género *Listeria* incluye 18 especies reconocidas (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, and *L. booriae*) de cocobacilos gram-positivos. Solamente dos especies *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, son consideradas patógenas.

Hasta 2009 la última especie identificada de *Listeria* fue *L. ivanovii* en 1984 (Seeliger y col., 1984). A partir de 2009 han sido descritas doce

especies de *Listeria* (*L. marthii*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae* y *L. costaricensis*) (Orsi y Wiedmann, 2016).

Se sugiere la organización del género *Listeria* en dos categorías que son *Listeria* sensu strictu que incluye *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, y *L. innocua*, y *Listeria* sensu lato que incluye las otras 12 especies de las cuales ninguna se describe como patógena (*L. grayi* y las 11 especies de *Listeria* descritas desde 2009) (Orsi y Wiedmann., 2016).

L. monocytogenes continúa siendo la especie más importante que puede causar enfermedad. Por ser uno de los patógenos más importantes que causa ETA, SENASA desde el año 2016, tiene como exigencia que las materias primas estén libres de dicho microorganismo. Si bien, es la única descrita como patógeno alimentario, en la industria de alimentos se utiliza el diagnóstico de *L. monocytogenes* y de *Listeria* spp., como indicador de condiciones que permiten la presencia, adhesión, desarrollo y persistencia de *L. monocytogenes*. (Pellicer y col., 2016).

1.3.2 Patogenicidad de *Listeria monocytogenes*

La patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad de adherirse y multiplicarse dentro de una gran variedad de células no fagocíticas (hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas), describiéndose diferentes etapas:

- Cruce de la barrera intestinal.
- Multiplicación en el hígado.
- Colonización del útero grávido y feto.
- Invasión del cerebro.

Este patógeno es multisistémico, sin embargo, los signos clínicos que se presentan en la mayoría de los casos de listeriosis humana, son debido al tropismo que presenta *L. monocytogenes* por el sistema nervioso central y el útero grávido

1.3.3 Resistencia a desinfectantes

Los mecanismos más significativos de resistencia de *L. monocytogenes* a los desinfectantes, los son la capacidad de adaptación y la formación de *biofilms*. Para lograr una alta efectividad con el empleo de desinfectantes, es condición indispensable cumplir con una excelente limpieza. Según la FAO: "*Limpieza es la eliminación de tierra, residuos de alimentos, suciedad, grasa u otras materias no aceptables*", debido a que la presencia o no de materia orgánica es un factor preponderante que determina el éxito de cualquier operación de desinfección, pues esta materia diluye y neutraliza rápidamente las sustancias químicas biocidas. 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*".

Los productos de saneamiento utilizados a lo largo de toda la cadena de fabricación de alimentos, en la fase de producción, previenen la propagación de agentes etiológicos. En la fase de transformación, la limpieza y desinfección pueden ser tomadas como sinónimo de higienización o sanitización, teniendo como finalidad reducir la población microbiana a niveles que no generen riesgos a la salud humana (Fuster i Valls., 2006).

La eficacia “in vitro” del hipoclorito de sodio, el yodo, los peróxidos, y los compuestos de amonio cuaternario frente a *L. monocytogenes* es conocida en ausencia de materia orgánica, aunque este microorganismo ha venido demostrando resistencia a más de 10 desinfectantes de superficies (Kahrs, 1995). Pan y col., (2006) estudiaron el comportamiento de *L. monocytogenes* simulando las condiciones de procesamientos de alimentos, utilizando las mismas superficies y desinfectantes *in vitro*. Los resultados obtenidos demostraron que los los 15 días de exposición los *biofilms* adquirirían resistencia a los desinfectantes utilizados en el estudio (amonio cuaternario y peróxidos de hidrogeno).

Castro Amaro., (2018) demostró la acción de dos desinfectantes a base de hipoclorito de sodio y amonio cuaternario a tres tiempos de contacto (5, 10 y 30 minutos), siendo eficiente para eliminar las *biofilms* a partir de los 30 minutos de exposición.

La resistencia a los desinfectantes puede ser originada por las cortas exposiciones y a los *biofilms* bacterianos, debido a ello Ruiz-Bolivar y col.,

(2008) aconsejaron realizar varios ciclos de desinfección, ya que la primera aplicación erradica la masa de células del *biofilms* separándola de las células persistentes, el siguiente ciclo de desinfección debe realizarse en tiempo y forma, debido a que las células persistentes que ya han estado en contacto con los desinfectantes pero no lo suficiente para ser eliminadas, son marcadas para iniciar el proceso de defensa ya sea mediante la producción de enzimas o la transferencia de información genética, confiriéndole a las capas celulares internas unos rasgos de resistencia que antes no tenían. Por esta razón, la primera película de células adherida a las superficies posee mayor resistencia a los productos empleados en la desinfección.

Según estudios realizados por Torres y col sobre la virulencia de *L monocytogenes* en más del 90% de los casos clínicos de los casos de listeriosis humana y animal, fueron responsables solo 3 serovariedades 1/2a, 1/2b y 4b.

1.4 Biofilms

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados: bacterias planctónicas (de libre flotación), y bacterias sésiles formando *biofilms*. Estos últimos, se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. (Nazar, 2007).

La formación de *biofilms* es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que ofrece cuatro importantes ventajas:

1. Protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos.
2. Incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento.
3. Facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación.
4. Posibilita la transferencia de material genético (ADN) (Conterton y col., 1999; Donlan, 2002).

El desarrollo de *biofilms* se produce en diferentes etapas, las cuales se describen en diferentes trabajos académicos (Schneider y Marshall, 1994; Pérez Elortondo y col., 1999; Meneses y Landoni, 2012; Díaz C. 2011; Copes, J. 2019).

- 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 Marshall, 1994).
- Segunda etapa: Corresponde a la adhesión reversible de microorganismos a una matriz. En principio, existe una aproximación de las células bacterianas a la superficie del material, pero sin entrar en contacto directo con ella. A continuación, se producirá el contacto como consecuencia de fuerzas electrostáticas de atracción-repulsión, de interacciones hidrofóbicas y de fuerzas de Van der Waals. Esta puede

sucedir 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 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. (Copes, J. 2019)

- Tercera etapa: esta etapa se denomina adhesión irreversible, porque la célula produce un enlace permanente a la matriz, mediado por diferentes apéndices celulares y la producción del exopolisacárido es diferente en cada bacteria, aquellas especies bacterianas que no producen exopolisacáridos tienen menor capacidad de adhesión y poder patógeno. (Copes, J. 2019)

- Cuarta etapa: en esta etapa se produce la maduración del *biofilms*, mediante el desarrollo de una estructura tridimensional muy compleja, con canales, poros y la redistribución de bacterias dentro de la matriz.

- Quinta etapa: liberación o desprendimiento de células. Por último, desde el *biofilms* pueden liberarse las células, el retorno de las células a la fase planctónica completa la imagen idealista del ciclo de desarrollo. (Meneses y Landoni, 2012). 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. Los tres principales mecanismos para generar el desprendimiento serían: (a) erosión:

remoción continua de pequeñas partes del *biofilms*; (b) separación: remoción rápida y masiva; y (c) abrasión: liberación por colisión de partículas suspendidas en el líquido circundante al *biofilms*. (Copes, J. 2019).

La liberación por abrasión cobra vital importancia a la hora de los programas de limpieza y desinfección. Esta acción mecánica debe ser realizada en forma minuciosa, de lo contrario, se podrían dispersar las bacterias en el medio ambiente y encontrar un nicho ecológico y formar *biofilms*.

2. Objetivo del trabajo

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de formación de *biofilms* de nueve cepas de *L. monocytogenes* (aisladas de superficies de acero inoxidable en cámaras frigoríficas) a 3°C durante 120 horas.

3. Materiales y métodos

3.1 Formación de *biofilms* sobre acero inoxidable.

Superficies estudiadas: Acero inoxidable (AI) de calidad AISI 304.

Cepas bacterianas utilizadas: Se utilizaron 9 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de las paredes cubiertas con acero inoxidable de cámaras frigoríficas que contenían medias reses bovinas. Las cepas fueron aisladas en la Laboratorio de análisis microbiológico de alimentos (LAMA) el año 2016, para el aislamiento de las mismas, se utilizó el procedimiento según International Standard ISO 11290-1: 2004 en

metodología analítica oficial microorganismos patógenos volumen 1 ANMAT (2011).

Preparación de los inóculos de las cepas aisladas: Las cepas mantenidas en crioviales a -70°C se sembraron en 5 ml de Caldo Cerebro Corazón (CCC, Britania, Argentina) y se incubaron 24 horas a 35°C .

Para determinar la concentración del inóculo se tomó 1 ml del caldo CCC y se realizó series de diluciones de base 10 de solución fisiológica estéril y posteriormente mediante pipeta se transfirió 0,1 ml de cada dilución en base 10 y se inoculó en la superficie del agar tripticasa soya (ATS, Britania, Argentina) incubándose 24 horas a 35°C . Para el recuento de UFC en superficies se utilizó la fórmula 1 (recuento de unidades formadoras de colonia en superficies). El inóculo que finalmente se utilizó para el experimento fue 1 ml con una concentración bacteriana $10^3 - 10^4$ UFC/ml (Silagyi, K. S., 2007; Ryu y col., 2004).

Preparación de los Bioensayos: En tubos de vidrio de 22 mm de ancho se depositaron 10 ml de caldo CCC, seguido se introdujo la superficie a estudiar de $1,5 \times 1,5$ cm. Se calibró el pH en 7,2 utilizando un pHmetro marca Altronix y (el agregado de una solución de hidróxido de sodio al 1% o ácido clorhídrico al 1% según fue necesario) y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. En los tubos que contenían los 10 ml de caldo y con la superficie de Al (previamente atemperado a 3°C), se le depositó 1 ml del inóculo y se incubó a 3°C durante 120 horas (Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de la metodología utilizada para los bioensayos con las cinco cepas bacterianas en 3 superficies y en las tres temperaturas de incubación.

<i>Cepa</i> <i>temperatura</i>		Tiempo de Incubación: 8 días								
		Superficie	Tiempo de toma de muestra (horas)							
<i>Listeria</i> spp	3 °C	Acero Inoxidable	3	6	12	24	48	72	96	120

3.2. Toma de muestra y procesado de las superficies de Al incubadas con cada cepa

Se extrajo la superficie de Al y se colocó en un tubo de vidrio de 22 mm con 10 ml de solución fisiológica (SF) estéril. Seguido, se agitó con vortex (Vicking mod. 6005) durante 20 segundos y se descartó la SF. Se realizaron 4 lavados. Con pinza Kocher se extrajo la superficie y se realizó el hisopado (hisopos Britania, Buenos Aires, Argentina). El hisopado se realizó en una sola cara de la superficie, se deslizó 10 veces de arriba hacia abajo y otras 10 veces de lado a lado. El hisopo se depositó en tubos con 5 ml de SF y se homogenizó con vortex durante 1 minuto. Luego se tomó 1ml y se realizaron 2 diluciones en base 10 para el recuento en placa.

Método horizontal para el recuento de microorganismos

aerobios: El recuento de colonias se realizó mediante la técnica de siembra en superficie según el procedimiento de la ISO 4833-2:2013. Inoculación e incubación: se transfirieron por duplicado 0.1 ml del inóculo en placas de Petri con agar PCA (*Plate count* agar, Britania) y se incubaron a 30°C, 72 horas (ANMAT 2004).

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.

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

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

En la tabla 2 se resumen todos los pasos realizados para la evaluación de la formación de *biofilms* en AI de 9 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de cámaras frigoríficas que contenían medias reses bovinas.

Tabla 2: Resumen de los ensayos para evaluar la formación de *biofilms* en Al de 9 cepas de *L. monocytogenes*.

1	Atemperado del medio de cultivo con la superficie a 3°C.
2	Inoculación de 1 ml a los 8 tubos con la superficie de Al.
3	Incubación a 3°C durante 192 horas.
4	Tiempo de toma de muestra: 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, y 120 horas.
5	Lavados con solución fisiológica.
6	Hisopado de superficie.
7	Lavado por 1 minuto.
8	Sembrado con 0,1 ml en agar recuento en placa.
9	Recuento final.

El modelo utilizado en este trabajo es el de Gompertz, 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, 2005; Pellicer K. 2011; Talero García, 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 = $a + c$) [Log UFC/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; Copes, 2019; Gianuzzi y col., 1991; Gianuzzi, 1998).

Los recuentos obtenidos en el presente trabajo no se ajustaron al modelado con la ecuación de Gompertz, razón por la cual se utilizó la ecuación modificada de Gompertz. (Hernandez y col., 2015) Dicha ecuación se aplicó a los datos del desarrollo microbiano mediante una regresión no lineal empleando el programa Systat. El algoritmo elegido calcula el conjunto de parámetros con el menor residuo de suma de cuadrados (RSS) y un 95% de intervalo de confianza para el crecimiento microbiano.

Análisis estadístico: Se utilizaron el análisis de Varianza (ANOVA) y el test de comparación de medios, Fisher LSD, con niveles de significación de 0,05 y 0,01. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Infostat (Di Rienzo, 2018). Se empleó un nivel de significación de $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Formación de biofilms a 3°C durante 120 horas.

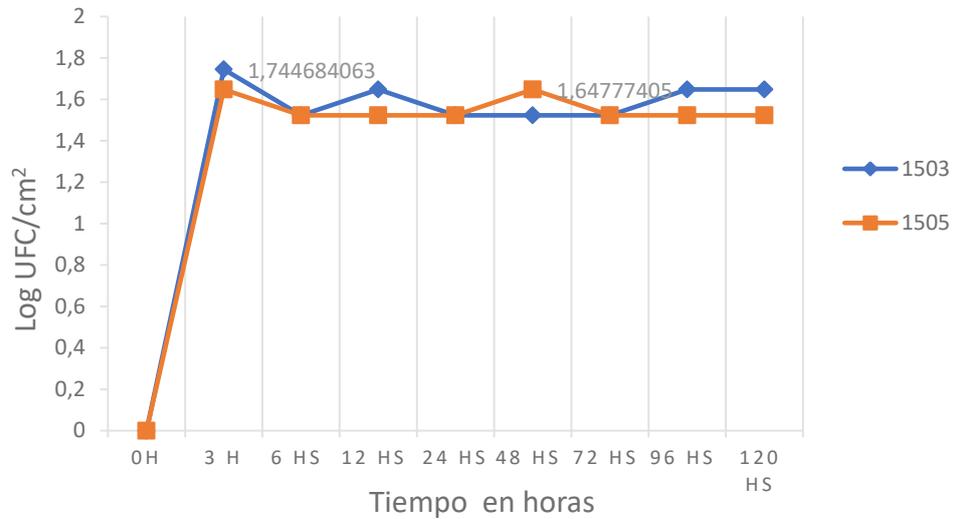
De las nueve cepas estudiadas, cinco (1502-1503-1504-1505-1508) fueron capaces de formar *biofilms* en la superficie utilizada para este estudio. Las cepas *L. monocytogenes* 1501, 1506, 1509 y 1510 no evidenciaron ningún tipo de recuento en las 120 horas de incubación. Es decir que el 55,5 % de las cepas aisladas poseían la capacidad de producir *biofilms*.

Las cepas *L. monocytogenes* 1503 y 1505 registraron crecimiento en todos los horarios de toma de muestra (ocho en total). La mayor concentración bacteriana la mostró la cepa 1503 a las 3 horas de incubación (1,74 log UFC/cm²). La menor concentración fue compartida y fue de 1,52 log UFC/cm². En la tabla 3 se muestran todos los valores obtenidos en el período de 3 a 120 horas de incubación. En el gráfico N°1 se muestran los resultados de la concentración bacteriana de ambas cepas (1503 y 1505) en función del tiempo de lectura.

Tabla 3: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 120 h de incubación sobre AI, de *Listeria monocytogenes* cepas 1503 y 1505 aplicando la fórmula 1.

		Cepas	
		1503	1505
Gráfico 1: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm ²)	Tiempo en horas		
	0	0,00	0,00
	3	1,74	1,64
	6	1,52	1,52
	12	1,64	1,52
	24	1,52	1,52
	48	1,52	1,64
	72	1,52	1,52
	96	1,64	1,52
120	1,64	1,52	

obtenidos en 120 h de incubación sobre AI, de *Listeria monocytogenes* cepa 1503 y 1505. Se muestran los mayores recuentos obtenidos en cada cepa.



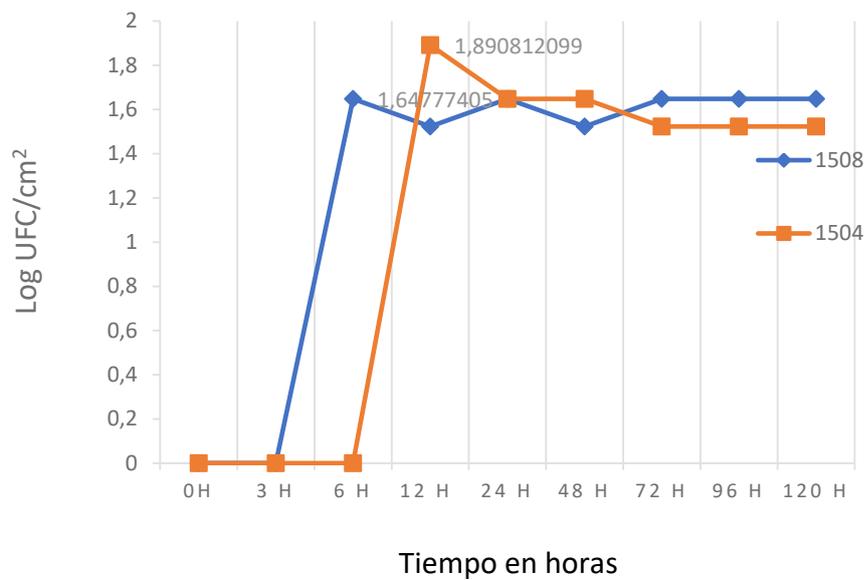
La cepa *L. monocytogenes* 1508 registró recuento a partir de las 6 horas. La mayor concentración bacteriana la mostró a las 6 horas de incubación (1,64 log UFC/cm²) el mismo también se obtuvo a las 24, 72, 96 y 120 horas. La menor concentración fue a las 12 y 48 horas de incubación (1,52 log UFC/cm²). La cepa *L. monocytogenes* 1504 mostró a las 12 horas una concentración de 1,89 log UFC/cm². Este fue el mayor valor obtenido en 120 horas de incubación en particular para esta cepa y las ocho restantes.

En la tabla 4 se muestran todos los valores obtenidos en el período de 3 a 120 horas de incubación. En el gráfico N° 2 se muestran los resultados de la concentración bacteriana de ambas cepas (1504 y 1508) en función del tiempo de lectura.

Tabla 4: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 120 h de incubación sobre AI, de *Listeria monocytogenes* cepa 1504 y 1508 aplicando la fórmula 1.

Tiempo en horas	Cepas	
	1504	1508
0	0,00	0,00
3	0,00	0,00
6	0,00	1,64
12	1,89	1,52
24	1,64	1,64
48	1,64	1,52
72	1,52	1,64
96	1,52	1,64
120	1,52	1,64

Gráfico 2: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 120 h de incubación sobre AI, de *Listeria monocytogenes* cepa 1504 y 1508. Se muestran los mayores recuentos obtenidos en cada cepa.

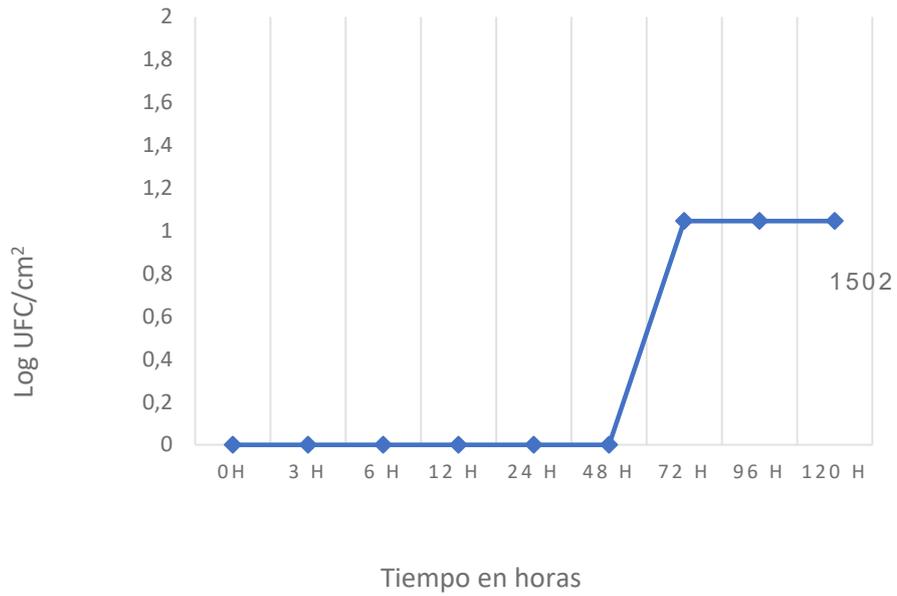


La cepa *L. monocytogenes* 1502 registró recuento a partir de las 72 horas. La mayor concentración bacteriana la mostró a las 72, 96 y 120 horas de incubación (1,04 log UFC/cm²). En la tabla 5 se muestran todos los valores obtenidos en el período de 3 a 120 horas de incubación.

Tabla 5: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 120 h de incubación sobre AI, de *Listeria monocytogenes* cepa 1502 aplicando la fórmula 1.

	Cepa
Tiempo en horas	1502
0	0,00
3	0,00
6	0,00
12	0,00
24	0,00
48	0,00
72	1,04
96	1,04
120	1,04

Gráfico 3: Valores de los recuentos bacterianos (UFC/cm²) obtenidos en 120 h de incubación sobre AI, de *Listeria monocytogenes* cepa 1502. Se muestran los mayores recuentos obtenidos en cada cepa.



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

Para realizar el ajuste de los datos al modelo propuesto, se utilizaron los promedios de los recuentos obtenidos en 120 horas 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 nueve cepas estudiadas. En la superficie estudiada, ninguna de las nueve cepas se ajustó a la ecuación de Gompertz.

5. Discusión

5.1 Desarrollo de biopelículas

Coincidiendo con diferentes investigadores, en el presente trabajo 5 cepas *L. monocytogenes* de produjeron *biofilms* en la superficie de Al, incubada a 3°C. Es decir que, el 55,5 % de las cepas aisladas poseían la capacidad de producir *biofilms*, un menor porcentaje que el observado por Villanueva y col., (2017) informaron la producción de *biofilms* en superficies, con el 64,5% de las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos. Di Bonaventura y col., (2008), obtuvieron biopelículas de 44 cepas de *L. monocytogenes* a 4°C en Al. Moltz A, Martin S (2005), informaron una concentración de 10^5 UFC/6,45 cm² en Al a 4°C durante 4 días. En el presente trabajo, los valores promedio de los recuentos, la concentración bacteriana de *L. monocytogenes* a 3°C durante 120 horas, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las superficies de Al.

En cuanto a la aplicación de la ecuación de Gompertz a las 9 cepas de *L. monocytogenes* estudiadas, se observó que las mismas no ajustaron al modelo empleado. Resultados similares fueron obtenidos por Copes, J. (2019) en *biofilms* de *Listeria* spp. en Al. Estos resultados podrían justificarse debido a que *L. monocytogenes* 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).

Brøndsted y col., (2003) demostró que *L. monocytogenes* al ser sometida a condiciones de estrés (temperatura 3°C y alta concentración de cloruro de sodio) se produce la activación de mecanismos genéticos que permiten la acumulación de solutos como Glicina y Betania para poder adaptarse y sobrevivir a dichas condiciones. Teniendo en cuenta esto y los resultados obtenidos en el presente trabajo, se llega a la conclusión que sería pertinente el diseño de futuros trabajos experimentales para investigar cuáles son los mecanismos fisiológicos o moleculares en *L. monocytogenes* relacionados con la capacidad de adhesión y formación de *Biofilms* bajo condiciones de estrés.

6. Bibliografía

1. Brøndsted, L., Kallipolitis, B. H., Ingmer, H., & Knöchel, S. (2003). kdpE and a putative RsbQ homologue contribute to growth of *Listeria monocytogenes* at high osmolarity and low temperature. *FEMS microbiology letters*, 219(2), 233-239.
2. Castro Amaro, N. A. (2018). Formación de biopelículas y su resistencia frente a dos desinfectantes en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de embutidos y superficies inertes. agregar si es tesis o revisión

3. Castro-Espinoza, L., Gortáres-Moroyoqui, P., Mondaca-Fernández, I., Meza-Montenegro, M. M., Balderas-Cortez, J. J., López-Cervantes, J., & Lares-Villa, F. (2009). Patógenos emergentes como restricción para el reúso de las aguas residuales municipales tratadas de Cd. Obregón, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 5(1), 9-21.
4. CDC. Diagnosis and Management of Foodborne Illnesses. 2001. Disponible en:falta
5. Chang L. 6° Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CICTA 6, Cuba. 1998.
6. Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N., & Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(2), 728-737.
7. Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens*, 6(3), 41.
8. Coll Cárdenas, F. J. (2005). *Modelado matemático del desarrollo microbiano en carnes bovinas* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
9. 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.

10. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
11. Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D'Orio V, Vergara A, Conter M, Lanieri A. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*; 104(6):1552-61.
12. 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/>
13. Díaz, C. (2011). Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
14. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
15. Elortondo, F. P., Salmeron, J., Albisu, M., & Casas, C. (1999). Formación de películas biológicas en la industria alimentaria/Biofilms in the food industry. *Food science and technology international*, 5(1), 25-30.
16. FDA Bad bug book 2009

17. Fuster Valls, N. (2007). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. Universitat Autònoma de Barcelona,.
18. 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 – 11.
19. 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.
20. Giannuzzi, L. (1998). Mathematical modeling of microbial growth in fresh filled pasta stored at different temperatures. *Journal of food processing and preservation*, 22(6), 433-447.
21. Giannuzzi, L., Pinotti, A., & Zaritzky, N. (1998). Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 39(1-2), 101-110.
22. Gill, C. O., Dussault, F. H. R. A., Holley, R. A., Houde, A., Jones, T., Rheault, N., ... & Quessy, S. (2000). Evaluation of the hygienic performances of the processes for cleaning, dressing and cooling pig carcasses at eight packing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 58(1-2), 65-72.

23. Hernández, L. A. R., Ortiz, J. M., López, J. A., Reyna, M. G. G., & Zacatecas, Z. (2015) El modelo de Gompertz como herramienta hacia la investigación multidisciplinaria en ciencias de la salud. In *Memorias Congreso Internacional de Investigación Científica Multidisciplinaria* (p. 67).
24. Julián, A., Jiménez, Á., de Górgolas, M., Fernández, R., & Fernández, M. L. (2001). Infecciones por *Listeria monocytogenes* en el adulto. Aspectos clínicos y microbiológicos de una enfermedad cambiante. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19(7), 297-303.
25. Kalmokoff, M. L., Austin, J. W., Wan, X. D., Sanders, G., Banerjee, S., & Farber, J. M. (2001). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of applied microbiology*, 91(4), 725-734.
26. Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005, August). Biofilms bacterianos e infección. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 28, No. 2, pp. 163-175). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
27. Meneses, M. L., & Landoni, M. F. (2012). Biofilms bacterianos. *Analecta Veterinaria*, 32.
28. Mengoni, G. B., & Apraiz, P. M. (2003). Monitoring of a HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) plan for *Listeria monocytogenes* control. *Revista Argentina de microbiología*, 35(4), 224-227.

29. Moltz A, Martin S. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*. 2005 Jan;68(1):92-7.
30. Mossel, D. A., Moreno García, B., & Struijk, C. B. (2003). *Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos*.
31. Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67(1), 161-172.
32. *Food control*, 22(10), 1573-1581.
33. Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273-5287.
34. Pan, Y., Breidt, F., & Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12), 7711-7717.
35. Pellicer, K. CAPÍTULO 5 *Listeria monocytogenes*. *Microbiología de alimentos*, 66. falta el año
36. Pellicer, K. Copes, J., Giannuzzi, L., Zaritzky, M. (2011). Behavior of *Listeria monocytogenes* type 1 355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. *Food control*, 22(10), 1573-1581.

37. Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2019). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food microbiology*, 82, 533-540.
38. Ruiz-Bolivar, Z., Poutou-Piñales, R. A., & Carrascal-Camacho, A. K. (2008). Resistencia antimicrobiana ya desinfectantes de *Listeria* spp. *Nova*, 6(10).
39. Ryu, J. H., Kim, H., Frank, J. F., & Beuchat, L. R. (2004). Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157: H7 as affected by curli production. *Letters in applied microbiology*, 39(4), 359-362.
40. Schneider, R. P., & Marshall, K. C. (1994). Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces—effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2(4), 387-396.
41. Schöbitz, R., Ciampi, L., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro sur*, 37(1), 1-8.
42. SENASA. Manual de procedimientos de desinfección. 2016.
43. Silagyi, K. S. (2007). *Biofilm formation by Escherichia coli O157: H7* (Doctoral dissertation).

44. Tao, J., Liu, W., Ding, W., Han, R., Shen, Q., Xia, Y., ... & Sun, W. (2020). A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens. *Journal of Food Science*.
45. Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., & Mercado, M. (2005). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*, microorganism zoonotic emergent. *Revista MVZ Córdoba*, 10(1), 511-543.
46. 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.
47. Whiting, R. C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(6), 467-494.