

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE *Listeria monocytogenes* AISLADAS DE CÁMARAS FRIGORÍFICAS

Copes J¹, Brusa V^{1,2}, de la Torre J¹, Pellicer K¹

¹Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, Buenos Aires, Argentina. ²IGEVET - Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N. Dulout" (UNLP-CONICET La Plata), Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, Buenos Aires, Argentina.

jcopes@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de formación de biopelículas de nueve cepas de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable. Se utilizaron 9 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de paredes de cámaras frigoríficas. Cada cepa se inoculó en tubos conteniendo caldo cerebro corazón y una sección de acero inoxidable, los que fueron incubados a 3 °C. Luego de 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas de incubación se realizó el recuento bacteriano de la sección de acero. El 55,5 % de las cepas aisladas, fueron capaces de producir biopelículas y una cepa mostró crecimiento a todas las horas de muestreo. A las 120 horas las biopelículas mantuvieron la concentración bacteriana dentro de un mismo logaritmo (1,04 a 1,89 log UFC/cm²), esto indicaría la persistencia del peligro en las cámaras de refrigeración. Se considera importante que todo establecimiento tenga en plan de muestreo el aislamiento e identificación de *Listeria spp.*

Palabras clave: biopelícula, *Listeria monocitogenes*, cámaras frigoríficas

EVALUATION OF THE BIOFILM FORMATION CAPACITY OF *Listeria monocytogenes* STRAINS ISOLATED FROM COLD ROOMS

Abstract: The aim of this work was to evaluate the biofilm formation of nine *L. monocytogenes* strains from stainless steel surfaces. Nine strains of *L. monocytogenes* isolated from abattoir cold chamber walls were used. Each strain was inoculated into tubes containing Brain Heart Broth and a stainless-steel section, and were incubated at 3°C. After 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours of incubation, the bacterial count of the steel section was performed. Fifty-five percent of the strains isolated produced biofilms and one strain showed growth at all sampling times. At 120 hours, the biofilms maintained the bacterial concentration within the same logarithm (1.04 to 1.89 log CFU/cm²), this would indicate the persistence of the hazard in the cool chamber. It is considered important that every abattoir have a sampling plan for the isolation and identification of *Listeria spp.*

Key Words: biofilm, *Listeria monocitogenes*, abattoir cold chamber

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes tiene la capacidad de resistir condiciones extrínsecas adversas, como temperaturas entre 1°C y 45 °C, pH 4,4-9,4 y concentraciones NaCl de 8 a 10 % (16). Estas características junto con su resistencia a los desinfectantes le confieren una gran capacidad de adaptación y de formación de biopelículas o *biofilms* (20). La listeriosis es una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) de baja frecuencia y que en algunos casos puede revestir gravedad y producir la muerte (17). La dosis infectiva aún no está claramente definida, sin embargo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos informó que la ingesta de hasta 100 células no afecta la salud de los consumidores sanos (9). Los grupos de riesgo son mujeres embarazadas (produce abortos, natimortos y nacimientos prematuros) y pacientes inmunodeprimidos (tratamientos contra el cáncer, trasplantados, personas enfermas de sida y los ancianos) en los cuáles se presenta con un cuadro invasivo con infección sistémica, septicemia y encefalitis conduciendo a la muerte o en su defecto puede dejar secuelas neurológicas (15). 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 (14).

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, Hazard Analysis and Critical Control Points) implementado en la industria alimentaria, como así también en los planes de prevención de enfermedades de las instituciones sanitarias (3). 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 (1).

Los mecanismos de resistencia de *L. monocytogenes* a los desinfectantes, son la capacidad de adaptación y la formación de biopelículas. Para lograr un exitoso control del microorganismo, es condición indispensable cumplir con exactitud los protocolos de limpieza y desinfección (13). La capacidad de *Listeria* spp. para formar biopelícula sobre superficies tales como acero inoxidable, plástico, teflón y vidrio han sido previamente informada (1, 6, 11, 20).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de formación de biopelículas de nueve cepas de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas. Se utilizaron 9 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de acero inoxidable que recubre las paredes de cámaras frigoríficas, que contenían medias reses bovinas (10). Las cepas fueron conservadas en tubos crioviales a -70 °C.

Preparación de los bioensayos: Cada una de las cepas aisladas se inocularon en 8 tubos que contenían 10 ml de caldo cerebro corazón (Lab. Britania, Argentina) y una sección de acero inoxidable (AI) estéril. A los 72 tubos se les adicionó un mililitro de inóculo (103–104 ufc/ml) y se incubó a 3 °C durante 120 horas. A las 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas de incubación se extrajo la superficie y se procedió al recuento bacteriano (6). La superficie incubada trasladó a un tubo con 10 ml de solución fisiológica y se le realizaron 4 lavados de 15 segundos con un agitador vortex Vicking modelo 6005 (Vicking, Buenos Aires, Argentina). Se extrajo la superficie con una pinza Kocher y se realizó un hisopado en una cara. Antes de la inoculación en medio sólido, el hisopo fue mezclado con 5 ml de solución fisiológica durante 1 minuto. Se inoculó 0,1 ml en superficie en agar recuento en placa (Britania, Buenos Aires, Argentina) y se incubó a 35 °C durante 48 horas. Para el recuento se utilizó la siguiente fórmula: Número de UFC/cm² x la cantidad de ml de diluyente/superficie del área hisopada.

El análisis estadístico se realizó con el análisis de la 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 (Universidad Nacional de Córdoba). Se empleó un nivel de significación de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Cinco de las cepas identificadas como Lama 1502-1503-1504-1505-1508, fueron capaces de producir biopelículas en la superficie de acero inoxidable utilizada en este estudio. Las cepas restantes (*L. monocytogenes* 1501, 1506, 1509 y 1510) no desarrollaron ningún tipo de crecimiento en la superficie de acero inoxidable durante las 120 horas de incubación. Este resultado muestra que el 55,5 % de las cepas aisladas, poseían la capacidad de producir biopelículas. Las cepas *L. monocytogenes* 1503 y 1505 crecieron en todos los horarios de toma de muestra. La mayor concentración bacteriana fue para la cepa 1503 fue de 1,74 log UFC/cm² y la menor concentración de 1,52 log UFC/cm².

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). En esta cepa se observó un crecimiento irregular dentro del tiempo de incubación (0,12 log). La cepa *L. monocytogenes* 1504 mostró a las 12 horas de incubación, una concentración de 1,89 log UFC/cm². Este fue el mayor valor obtenido durante todo el tiempo de incubación.

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).

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las cepas utilizadas.

DISCUSIÓN

El resultado obtenido en este trabajo fue que 5 cepas (55 %) de *L. monocytogenes* produjeron biopelículas en la superficie de acero inoxidable, incubada a 3 °C durante 120 horas. Este porcentaje fue menor al 64,5 % informado por Villanueva y col. (2017) y el 100 % de Di Bonaventura y col. (2008) (8 y 20).

En base a los datos obtenidos en este trabajo, no todas las cepas *L. monocytogenes* tienen capacidad de producir biopelícula. Esta incapacidad no es limitante para que estos microorganismos representen un riesgo de contaminación de los alimentos. La capacidad de *L. monocytogenes* en persistir en superficies, está relacionada con la incapacidad de movimiento y adaptarse a los nichos ecológicos existentes (2, 19). Las cepas que poseen la capacidad de formar biopelículas no solo resisten cambios extremos en el medio ambiente (ya sea biótico o abiótico), también tienen la capacidad de perpetuarse en el nicho y lograr la madurez de la biopelícula, condición necesaria, para dispersar “bloques” de bacterias en el medio ambiente (5, (18).

Con respecto al comportamiento observado en las biopelículas estudiadas en este trabajo, no mostraron una alta concentración bacteriana (1,89 log UFC/cm²). Un punto importante observado en el periodo de incubación fue que a las 120 horas las biopelículas mantuvieron la concentración bacteriana dentro de un mismo logaritmo (1,04 a 1,89 log UFC/cm²), esto indicaría la persistencia del peligro en las cámaras de refrigeración.

Por último y a modo de conclusión general, se considera importante que todo establecimiento tenga en plan de muestreo el aislamiento e identificación de *Listeria* spp. Esto sería de gran ayuda ya que, si se obtiene un aislamiento del microorganismo hay una alta probabilidad que la bacteria haya formado un biopelícula y pueda esparcirse y contaminar el producto. También, es determinante para evaluar la efectividad de los POES implementados en la planta, ya que deberán modificarse para lograr el control de *L. monocytogenes*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Sr. Leandro Del Intento por su valiosa colaboración.

CONFLICTOS DE INTERESES

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales u de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo

BIBLIOGRAFÍA

1. Bo-Hyung L, Cole S, Badel-Berchoux S, Guillier L, Felix B, Krezdorn N, Bernardi T, Sultan I, Piveteau P. Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* Strains Under Food Processing Environments and Pan-Genome-Wide Association Study. *Front Microbiol* 2019; 10: 2698.
2. Carpentier B, Cerf P. Persistence of *Listeria monocitogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol* 2011; 145:1–8
3. Castañeda-Ruelas G, Chaidez Quiroz C, Salazar Gimenez D, Hernandez Chiñas D, Eslava Campos C. *Listeria monocitogenes* y la listeriosis, problema de salud pública en México. *Salud pública Méx* 2018; 60 (4).
4. Castañeda-Ruelas G, Salazar-Jiménez E, Hernández-Chiñas U, Eslava-Campos E, Chaidez-Quiroz C. Capacidad de adherencia e índice de invasión de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y casos clínicos en México. *Revista bio ciencias* 2019; (6).
5. Colagiorgi A, Bruini Il, Pierluigi A, Di Ciccio , Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens* 2017; 6(3): 41.
6. Copes J. 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”. 2019. Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/88776/Documento_completo..pdf?sequence=1&isAllowed=y
7. Copes J, Pellicer K, Echeverría K, Stanchi K, Martínez M, Leardini N. Investigation of *Listeria monocitogenes* in soft cheeses. *Rev Argent Microbiol* 2000; 32(1):49-52.
8. Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D’Orío V, Vergara A, Conter M, Lanieri A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocitogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol.* 2008; 104(6):1552-61.
9. Food and Drug Administration (FDA). Control of *Listeria monocitogenes* in Ready-To-Eat Foods: Guidance for Industry Draft Guidance 2017. Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/draft-guidance-industry-control-listeria-monocytogenes-ready-eat-foods>.
10. Isequilla, A. Estudio microbiológico de *Listeria monocitogenes* en cámaras de maduración. Evaluación del protocolo de sanitización vigente. 2018. Tesina para optar al Título de Especialista en Seguridad Alimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/76494>
11. Kocot A, Olszewska M. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocitogenes* in a food processing context. *LWT* 2017; 84: 47-57.
12. Lee B-H, Cole S, Badel-Berchoux S, Guillier L, Felix B, Krezdorn N, Hébraud M, Bernardi T, Sultan I. Biofilm Formation of *Listeria monocitogenes* Strains Under Food 2019. Processing Environments and Pan-Genome-Wide Association Study. *Front Microbiol* 2019; 10: 269.
13. Ministerio de Agroindustria de la Nación. Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento. 2022. Disponible en: https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/productos_acuicolas/_archivos/000000_Manual%20Gu%C3%ADa%20POES.pdf.
14. OMS. Listeriosis. 2018. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>.
15. Ramos Cela M, Medina Martínez A, Vera M. Infección de *Listeria monocitogenes* en el Sistema Nervioso Central: patogénesis celular, diagnóstico y factores de riesgo. *AMU* 2022. Disponible en: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/75040/ES%20-%20Listeriosis.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.
16. Real, D Evaluación de la capacidad para formar biofilms a 3°C de 9 cepas de *Listeria monocitogenes*. Tesina para optar al Título de Especialista en Seguridad Alimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/127617>. 2020
17. Salud Rubio Lozano M, Martínez Bruno J, Hernández Castro R, Bonilla Contreras C, Méndez Medina R, Núñez Espinosa J, Echeverry A, Brashears M. Detección de *Listeria monocitogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México. *Rev mex de cienc pecuarias* 2013; 4 (1).
18. Santos T, Viala D, Chambon E, Esbelin J, Hébraud H. *Listeria monocitogenes* Biofilm Adaptation to Different Temperatures Seen Through Shotgun Proteomics. *Front Nutr* 2019; 6: 89.

19. Solís Zamora L, Formación De Biopelículas En La Industria De Alimentos Asociados A *Listeria monocitogenes*. Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Programa De Microbiología Industrial 2020 <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/53747/trabajo%20de%20grado%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

20. Villanueva D, Salazar M. Formación de biopelículas por *Listeria monocitogenes* aisladas de queso fresco de mercados del Cercado de Lima. An Fac 2017; 78 (3).