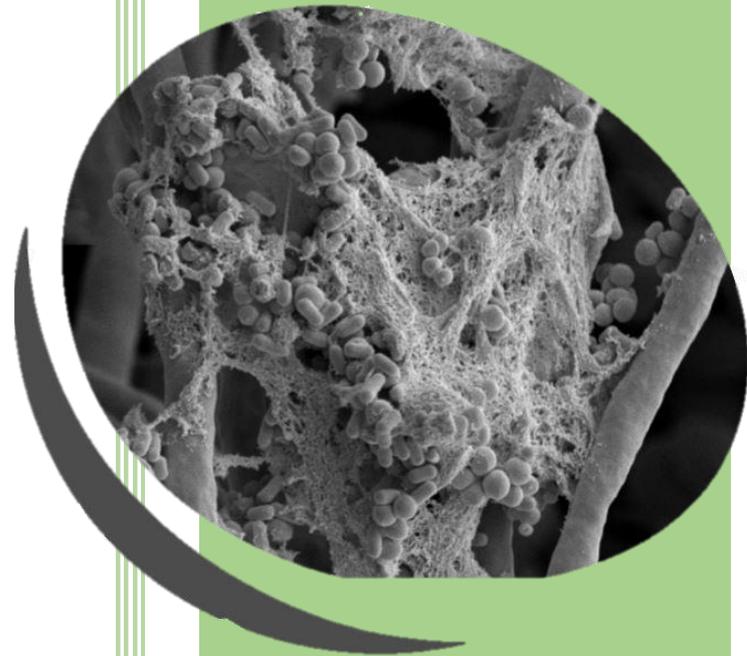




UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

FORMACIÓN DE  
BIOFILMS  
MULTIESPECIE  
ASOCIADOS A  
SUPERFICIES DE LA  
INDUSTRIA  
ALIMENTARIA:  
ESTRATEGIAS DE  
BIOCONTROL



AGUSTIN MARIA DEL ROSARIO

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2023



# Universidad Nacional del Sur

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

Formación de biofilms multiespecie asociados a  
superficies de la industria alimentaria: estrategias de  
biocontrol

Agustín, María del Rosario

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2023

## **PREFACIO**

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar por el grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito de Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR-CONICET-UNS) y la Cátedra de Microbiología Industrial y de los Alimentos dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur (UNS), durante el periodo comprendido entre 02 de mayo 2017 al 17 de febrero 2023, bajo la dirección de la Dra. Lorena I. Brugnoni, Asistente en Docencia del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur e Investigadora Independiente del CONICET y la Dra. María Soledad Vela-Gurovic.

Fecha: 17/02/2023

Mic. María del Rosario Agustín

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Lorena I. Brugnani por aceptar la dirección de la presente Tesis Doctoral, por su confianza, por su ilimitado apoyo, por guiarme y acompañarme en este lindo proceso de formación. Gracias por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por su paciencia y por el cariño con el que me trató desde el día que llegué.

A la Dra. María Soledad Vela-Gurovic por haber aceptado la co-dirección de la presente Tesis Doctoral y por sus constantes aportes a mis conocimientos académicos. Gracias por brindarme las herramientas necesarias para completar mi formación.

A la Dra. María Amelia Cubitto del Laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos por aceptarme en su laboratorio, y por lo compartido diariamente.

A La Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación y al Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica por su financiación durante los primeros tres años de doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca de finalización de doctorado.

A los profesionales del LIUC (Departamento de Química), en particular al Lic. Marcelo Pereira y la Dra. Andrea Constantino, por su acompañamiento y su predisposición ante las dudas en los ensayos realizados en su laboratorio.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la UAT Bahía Blanca, a Cecilia Gutiérrez Ayesta por su asistencia técnica.

A la Universidad Nacional del Sur, por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de posgrado. Un honor conocer y ser parte de esta comunidad universitaria en estas instancias de mi desarrollo profesional.

A mis compañeras de laboratorio, Patricia, Gabriela y Clara, quienes también colaboraron y guiaron para que pueda trabajar cómoda, en equipo y en forma organizada. Gracias por todo lo compartido, las charlas, mates, risas y principalmente por su compañía diaria, en los días buenos y en los malos.

A la Dra. Mareike Müller y al grupo de investigación liderado por el Prof. Holger Schönherr de la Universität Siegen, Alemania, por su recibimiento y por permitirme realizar una pasantía de investigación en su laboratorio.

A mis amigas del pueblo y a mis microbios de la UNRC que siempre están presentes.

A Flavia, Angie, Mariano, Pablo, mis salseros Bahienses preferidos. Gracias por todos los bailes, cenas, mates y brindis compartidos. Fueron fundamental en esta etapa. Siempre voy a estar agradecida de la amistad que me brindaron en todos estos años.

A los amigos, compañeros y profesores que conocí en salsa, voley y en zumba (Lucia, Andrea, Christian), y a las chicas del team de La Esperanza (Maca, Mechi, Nani, Mai, Mari). Gracias por la buena energía de siempre, han hecho mis días más divertidos y activos.

También a todos los compañeros de inglés y alemán. Me llevo un hermoso recuerdo de todos.

A mi familia, mi sostén desde y para toda la vida. A mi hermana Nadia, mis hermanos Marcelo y Carlos, mis cuñadas Carina y Celeste y mi cuñado Franco, que me acompañan desde siempre y me alientan a seguir creciendo. Agradecida siempre por formar la familia que tenemos. Los quiero.

A mis cuatro sobrinos, mis preciosos, Nazareno, Ismael, Lorenzo, Mateo y a mi pequeña ahijada-sobrina, Francina. Su amor, sus abrazos, y sus charlas siempre alegran mi corazón. La tía los ama y siempre estará para ustedes.

A mi compañero incondicional, Tobías. Fundamental en todo este proceso de formación y crecimiento en Bahía, casi desde el día 1. Gracias por tu compañía diaria, por cuidarme, en la cercanía y a la distancia, siempre estás. Agradezco tu confianza, tu paciencia y tu amor sincero. Gracias por la vida compartida. Ich liebe dich.

A mi mamá Norma, que desde el primer día me apoyó en la decisión de comenzar este camino, aunque era difícil estar lejos de casa. Gracias por ser mi sostén, por preocuparte y ocuparte, por tu amor incondicional y por tu fortaleza de cada día. Siempre voy a estar agradecida por todo lo que me brindaste. Te dedico este logro, que claramente es tuyo también.

Y, por último, y mi dedicatoria más especial es para mi papá Luis. Agradecida a la vida que me viste comenzar este camino y me alentaste, con miedos e incertidumbres, pero siempre con mucho amor. Gracias por ser mi guía eternamente y por enviarme las fuerzas que necesite para

seguir. Sé que de donde está, va a estar orgulloso. Ojalá sepas que esta meta cumplida también es por y para vos.

## RESUMEN

Teniendo en cuenta el número de industrias alimentarias afectadas por el desarrollo de biofilms, es imprescindible un análisis integral e interdisciplinario de los factores que intervienen en su formación a fin desarrollar estrategias de remoción o prevención de estos. En esta tesis se propuso como objetivo principal profundizar el conocimiento sobre la adhesión, formación y producción de metabolitos en los biofilms formados por levaduras, principales deteriorantes de la industria productora de jugos, en presencia de bacterias patógenas pertinentes a la seguridad de los jugos de frutas, a fin de evaluar posibles estrategias de biocontrol.

En el **Capítulo I**, se analizaron los biofilms multiespecie formados por levaduras y su asociación con bacterias patógenas, basándose en la hipótesis de que las levaduras presentes en la microbiota residente de las superficies de los equipos de producción de jugos de frutas pueden favorecer la persistencia de las bacterias a través de la formación de biofilms. Inicialmente, se llevaron a cabo estudios de los parámetros relacionados con la formación de biofilms de *Listeria monocytogenes*. Los resultados demostraron que *Listeria* exhibe un carácter altamente hidrofóbico, es móvil, produce curli y celulosa, es viable en jugo de manzana y se adhiere al acero inoxidable (AI) a 25 °C. Seguidamente, se describieron los biofilms formados por *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida kefyr*, en presencia de *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* o *Escherichia coli* O157:H7, sobre AI y membranas de ultrafiltración (MUF), empleadas para la clarificación de los jugos. Los análisis sobre los biofilms se realizaron empleando técnicas de recuento en placa, microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido. Los resultados revelaron que las estructuras levaduriformes (pseudohifas, blastoporas) proporcionan un entorno propicio para el anclaje y la adhesión de las bacterias patógenas, convirtiéndose así en un nicho elegible para su permanencia en un ambiente que simula la producción de jugos de frutas.

En el **Capítulo II**, se exploró la actividad inhibitoria y antibiofilm de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (LGG) y *Lactobacillus casei* ATCC 393 frente a *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7. Se evaluaron dos estrategias de biocontrol: competencia, en la cual tanto las células de *Lactobacillus* como las bacterias patógenas colonizan simultáneamente la superficie de AI; y exclusión, donde se forma un biofilm protector con células de *Lactobacillus* sobre la superficie de AI previo a la incorporación de las bacterias patógenas. Ambas especies de *Lactobacillus*: presentaron alta capacidad adhesiva sobre AI, sin alterar los parámetros fisicoquímicos del jugo de manzana. Además, estas cepas mitigaron la proliferación y adhesión de las bacterias patógenas hasta niveles no detectables en

AI. Estos resultados sugieren que las cepas de *Lactobacillus* estudiadas podrían ser candidatas prometedoras para la formación de biofilms protectores en entornos de producción de jugos, ofreciendo una estrategia efectiva para controlar la adhesión microbiana en superficies relacionadas con la industria alimentaria.

Con el objetivo de reducir o prevenir la colonización de las levaduras en las superficies y, de este modo, evitar la adhesión de bacterias patógenas que puedan entrar al sistema de producción de jugos de frutas, en el **Capítulo III** se evaluó la eficacia de moléculas quorum sensing (MQS) producidas por levaduras y del agente antifúngico natamicina (NAT), que se utiliza habitualmente en la industria alimentaria. En primer lugar, se identificaron compuestos orgánicos volátiles (VOC) en biofilms de levaduras, y cuantificaron en presencia y ausencia de bacterias patógenas afectaba su producción. La técnica de extracción con disolventes y la micro extracción en fase sólida se emplearon para la extracción de COV, seguida de un análisis mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Los resultados demostraron que los biofilms de *C. tropicalis* producen farnesol (FAR), tirosol (TIR) y 2-feniletanol (2-FE), tres compuestos reconocidos como MQS. Por otro lado, la presencia de las bacterias patógenas no afectó significativamente ( $p>0,05$ ) la producción de los COV liberados por las levaduras. En segundo lugar, se analizó el efecto de farnesol 0,06 mM (FAR) en combinación con natamicina 0,01 mM (NAT) sobre biofilms de levaduras y multiespecie formados sobre AI y MUF. Los biofilms tratados con NAT+FAR mostraron inhibición de la filamentación de las levaduras y una alteración significativa de la estructura tridimensional tanto en AI como en MUF. Además, se observó una disminución en la adhesión de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 en los biofilms multiespecie. La combinación NAT+FAR podría considerarse un agente de control prometedor para prevenir la formación de biofilms en las líneas de procesamiento de jugo de manzana.

## ABSTRACT

Considering the number of food industries affected by the development of biofilms, a comprehensive and interdisciplinary analysis of the factors involved in their formation is essential to develop strategies for their removal or prevention. The main objective of this thesis was to deepen the knowledge of the adhesion, formation, and production of metabolites in biofilms formed by yeasts, the main spoilage agents in the juice production industry, in the presence of pathogenic bacteria relevant to the safety of fruit juices, to evaluate possible biocontrol strategies.

**Chapter I** examined the association between yeasts and foodborne pathogens in biofilms multispecies, based on the hypothesis that yeasts present in the resident microbiota on the surfaces of fruit juice production equipment may favour the persistence of bacteria through the formation of biofilms. Initially, studies were carried out on parameters related to biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. Results indicate that *Listeria* has a highly hydrophobic character, is mobile, produces both curli and cellulose, is viable in apple juice, and adheres to stainless steel (SS) at 25 °C. Biofilms formed by *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida kefyr* in the presence of *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* or *Escherichia coli* O157:H7 on SS and ultrafiltration membranes (UFM), were described. Biofilm analyses were performed using plate counting, fluorescence microscopy and scanning electron microscopy techniques. The results revealed that yeast-like structures (pseudohyphae, blastopores) supply a favourable environment for adhesion and adherence of pathogenic bacteria, thus becoming an eligible niche for their permanence in an environment that simulates fruit juice production.

**Chapter II** aimed to investigate the inhibitory and antibiofilm efficacy of *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (LGG) and *Lactobacillus casei* ATCC 393 against *L. monocytogenes*, *S. enterica* and *E. coli* O157:H7. Two biocontrol strategies were evaluated: competition, in which *Lactobacillus* cells and pathogenic bacteria colonise the SS surface at the same time; exclusion, in which a protective biofilm with *Lactobacillus* cells is formed on the SS surface and pathogenic bacteria are after incorporated. Both *Lactobacillus* species adhered to AI, without altering the physicochemical parameters of the apple juice. Furthermore, these strains mitigated the proliferation and adhesion of pathogenic bacteria to undetectable levels on AI. These results suggest that the studied *Lactobacillus* strains could be promising candidates for the formation of protective biofilms in juice production environments, offering an effective strategy to control microbial adhesion on food industry-related surfaces.

To reduce or prevent yeast colonization on surfaces and thus avoid the adhesion of pathogenic bacteria that may enter the fruit juice production system, the efficacy of quorum sensing molecules (QSM) produced by yeasts and the antifungal agent natamycin (NAT), which is commonly used in the food industry, was evaluated in **Chapter III**. First, it was identified and quantified the volatiles organic compounds (VOC) released by the yeast biofilms, and then, it was assessed whether the presence of pathogenic bacteria affected the production of these metabolites. The solvent extraction technique and solid phase microextraction were used for metabolite extraction, followed by analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The results showed that *C. tropicalis* biofilms produce farnesol (FAR), tyrosol (TIR) and 2-phenylethanol (2-FE), recognized as MQS. On the other hand, the presence of the pathogenic bacteria did not significantly ( $p>0.05$ ) alter the production of the VOC released by the yeasts. Second, it was evaluated the effect of farnesol 0.06 mM with NAT 0.01 mM on yeast and multispecies biofilms formed on SS and UFM. Biofilms treated with NAT+FAR showed inhibition of yeast filamentation and a significant alteration of the three-dimensional structure of both AI and MUF. In addition, decreased adhesion of *L. monocytogenes*, *S. enterica* and *E. coli* O157:H7 was observed in the multispecies biofilms. The NAT+FAR combination could be considered as a promising control agent to prevent biofilm formation in apple juice processing lines.

# INDICE

<i>PREFACIO</i>	2
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	3
<i>RESUMEN</i>	6
<i>ABSTRACT</i>	8
<i>INDICE</i>	10
<i>INTRODUCCIÓN GENERAL</i>	16
<b>1. BIOFILMS</b>	<b>16</b>
1.1 Generalidades	16
1.2 Proceso de formación de los biofilms	17
1.3 Comunicación celular: <i>quorum sensing</i>	21
1.3.1 <i>MQS en levaduras</i>	23
1.4 Problemática de los biofilms	25
<b>2. INOCUIDAD ALIMENTARIA Y ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA)</b>	<b>27</b>
2.1 Agentes asociados a ETA	28
2.2 ETA en Argentina	29
<b>3. LISTERIA</b>	<b>30</b>
3.1 Generalidades	30
3.2 Listeriosis	30
3.3 Brotes asociados a <i>Listeria monocytogenes</i>	31
3.4 Adhesión y formación de biofilms	32
<b>4. JUGOS DE FRUTAS</b>	<b>33</b>
4.1 Producción de jugos de frutas en Argentina	33
4.2 Superficies utilizadas en la producción de jugos frutas	34
4.2.1 <i>Membranas de ultrafiltración</i>	36
4.3 Microorganismos deteriorantes y contaminantes	37
<b>5. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LOS BIOFILMS</b>	<b>38</b>
5.1 Empleo de bacterias ácido-lácticas	40
5.2 Natamicina	42
<i>MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES</i>	<i>47</i>
6. Medios de cultivos	47

<b>7. Soluciones y Buffers.....</b>	<b>49</b>
<b>8. SISTEMA DE ESTUDIO.....</b>	<b>50</b>
8.1 Matriz alimentaria: jugo de manzana _____	50
8.2 Superficies de uso alimentario _____	51
<b>9. MICROORGANISMOS EMPLEADOS.....</b>	<b>51</b>
9.1 Levaduras _____	52
9.2 Bacterias patógenas _____	53
9.3 Bacterias del ácido láctico (BAL) _____	53
<b>10. FORMACIÓN DE BIOFILMS.....</b>	<b>54</b>
<b>11. ESTUDIO DE LOS BIOFILMS MEDIANTE LA TÉCNICA DE RECuento.....</b>	<b>55</b>
<b>12. ESTUDIO DE LOS BIOFILMS MEDIANTE TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.....</b>	<b>56</b>
12.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) _____	56
12.2 Microscopía de Fluorescencia _____	57
<b>13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>58</b>

***CAPITULO I. BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A BROTES EN FRUTAS Y DERIVADOS: IMPACTO DE LA MICROBIOTA RESIDENTE EN LA FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE ACERO INOXIDABLE Y MEMBRANAS DE ULTRAFILTRACIÓN***

**60**

<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>60</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>60</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
<b>I.1. Caracterización fisicoquímica de <i>Listeria</i> _____</b>	<b>65</b>
1.1.1 Ensayo de hidrofobicidad _____	65
1.1.2 Producción de curli y celulosa _____	66
1.1.3 Ensayos de motilidad _____	67
1.1.4 Ensayos de agregación _____	67
1.1.5 Supervivencia de <i>Listeria</i> en jugo de manzana _____	68
<b>I.2 Biofilms sobre acero inoxidable _____</b>	<b>69</b>
<b>I.3 Biofilms sobre membranas de ultrafiltración (MUF) _____</b>	<b>70</b>
1.3.1 Adhesión y formación de los biofilms mono especie de <i>R. mucilaginosa</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. kefir</i> y de la mezcla de levaduras. _____	70
1.3.2 Formación de biofilms multiespecie: mezcla de levaduras en presencia de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enterica</i> y <i>E. coli</i> 0157:H7. _____	70

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>72</b>
<b>I.4 Caracterización fisicoquímica de <i>Listeria</i> .....</b>	<b>72</b>
I.4.1 Ensayo de hidrofobicidad .....	72
I.4.2 Expresión de celulosa y fimbria curli .....	72
I.4.3 Motilidad .....	73
I.4.4 Autoagregación y coagregación .....	74
I.4.5 Supervivencia de <i>Listeria</i> en jugo de manzana .....	75
<b>I.5 Adhesión y formación de biofilms sobre acero inoxidable .....</b>	<b>76</b>
I.5.1 <i>Listeria innocua</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> .....	76
I.5.2 Biofilms de <i>R. mucilaginosa</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. kefir</i> .....	78
I.5.3 Biofilms duales y multiespecie .....	82
<b>I.6 Biofilms sobre membranas de ultrafiltración .....</b>	<b>85</b>
I.6.1 Formación de biofilms de las levaduras (mono especie y mezcla de levaduras) .....	85
I.6.2 Formación de biofilms multiespecie. ....	88
<b>DISCUSION .....</b>	<b>91</b>
<b>I.7 Hidrofobicidad, producción de curli y celulosa y motilidad de <i>Listeria</i> .....</b>	<b>91</b>
<b>I.8 Supervivencia y adhesión mono especie de <i>L. innocua</i> y <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>92</b>
<b>I.9 Formación de biofilms sobre AI y MUF .....</b>	<b>95</b>
 <b>CAPITULO II.    ESTRATEGIAS DE BIOCONTROL EMPLEANDO BACTERIAS</b>	
<b>ÁCIDO-LÁCTICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>101</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>101</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>102</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>105</b>
<b>II.1 Caracterización de las BAL.....</b>	<b>105</b>
II.1.1 Actividad antimicrobiana .....	105
II.1.2 Agregación .....	106
<b>II.2 Supervivencia, adhesión y efectos antagónicos de BAL .....</b>	<b>106</b>
II.2.1 Análisis fisicoquímico .....	107
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>108</b>
<b>II.3 Caracterización de las BAL.....</b>	<b>108</b>
II.3.1 Efecto inhibitorio de los sobrenadantes .....	108
II.3.2 Agregación .....	108
<b>II.4 Caracterización de las BAL en jugo de manzana .....</b>	<b>110</b>
III.4.1 Supervivencia y adhesión .....	110
II.4.2 Análisis fisicoquímico .....	113

II.5 Efecto antagónico de las BAL sobre bacterias patógenas: competencia (co-adhesión) y exclusión (biofilm preformado de BAL).	114
<b>DISCUSION</b>	<b>116</b>
II.6 Caracterización de las BAL	116
II.7 Efecto de <i>Lb. rhamnosus</i> y <i>Lb. casei</i> sobre las bacterias patógenas	118
<b>CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES Y ESTRATEGIAS DE REMOCIÓN Y/O PREVENCIÓN DE BIOFILMS</b>	<b>122</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>122</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>122</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>123</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>126</b>
III.1 Identificación y cuantificación de COV: GC/MS	126
III.2 Técnicas de preconcentración de las muestras	127
III.2.1 Técnica de extracción por solventes	129
III.2.2 Técnica de HS/SPME	130
III.3 Cuantificación de 2-feniletanol en biofilms de <i>C. tropicalis</i> y <i>L. monocytogenes</i>	132
III.4 Cuantificación de COV en biofilms mediante el método de estándar interno	134
III.5 Estrategias de remoción y prevención de biofilms	134
III.5.1 Efecto de TIR, FAR y 2-FE sobre biofilms de levaduras en acero inoxidable	134
III.5.2 Efecto de natamicina sola y en combinación con farnesol sobre biofilms	135
<b>RESULTADOS</b>	<b>137</b>
III.6 Identificación de COV en biofilms de <i>C. tropicalis</i>	137
III.7 Cuantificación de 2-feniletanol en biofilms de <i>C. tropicalis</i> y <i>L. monocytogenes</i>	138
III.8 Identificación de COV en biofilms de levaduras y bacterias	139
III.9 Efecto de tirosol, 2-feniletanol y farnesol en biofilms de levaduras sobre AI	139
III.10 Estrategia de remoción de biofilms con NAT en combinación con FAR	145
III.10.1 Efecto de NAT sola y en combinación con FAR sobre biofilms monoespecie de levaduras sobre acero inoxidable	145
III.10.2 Efecto de NAT+FAR sobre cultivos planctónicos y biofilms multiespecie	150
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>158</b>
III.11 Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles	158
III.11.1 Identificación de COV en biofilms de <i>C. tropicalis</i>	158
III.11.2 Identificación y cuantificación de COV en biofilms de levaduras en presencia de bacterias patógenas	159
III.12 Estrategias de remoción de biofilms	161
III.12.1 En biofilms de levaduras sobre AI	161

*III.12.2 Efecto de NAT+FAR sobre cultivos planctónicos y biofilms multiespecie sobre AI y MUF \_ 165*

**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS** ..... 169

**BIBLIOGRAFÍA** ..... 173

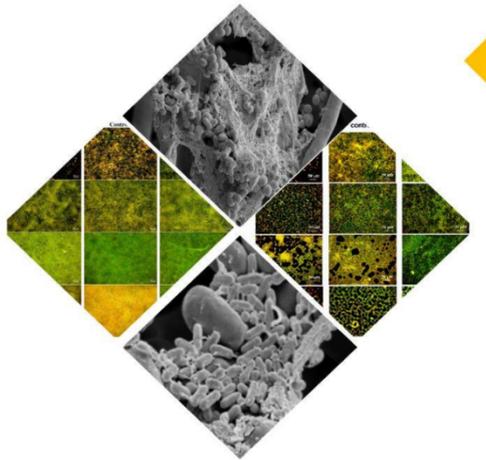
**ANEXO** ..... 222

**Trabajos publicados y presentaciones a congresos**..... 222

**Publicaciones en revistas internacionales** ..... 222

**Resúmenes presentados en congresos** ..... 222

**ESTANCIAS Y PASANTIAS**..... 225



# INTRODUCCIÓN GENERAL

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. BIOFILMS

#### 1.1 Generalidades

Durante muchos años se creyó que los microorganismos que habitan el planeta lo hacían principalmente en forma planctónica, como células de vida libre, considerándolos como organismos independientes, sin necesidad de organización ni de comunicación (Giaouris et al., 2014). En el siglo XVI, Antonie Van Leeuwenhoek (1684) observó que los microorganismos se encontraban adheridos a superficies dentales y formaban comunidades sésiles utilizando un microscopio de luz simple. Sin embargo, este concepto de microorganismos adheridos se retoma recién a principios del siglo XX, cuando Zobell, (1943) y Costerton et al. (1978, 1987) observaron que además de adherirse a una superficie sólida, estos se encontraban embebidos en una matriz autoproducida, constituida por un conglomerado de distintos tipos de biopolímeros compuestos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), proteínas y ADN extracelular (ADNe). En la actualidad se acepta ampliamente que los microorganismos residen en pequeñas comunidades, adheridas a superficies y conectadas unas a otras, a estas se lo denomina biopelículas o *biofilms* (Donlan, 2002). Con el tiempo el concepto de biofilms se ha modificado y hoy en día podemos definirlos como sistemas complejos, formados por una comunidad microbiana sésil, compuesta por microorganismos de diferentes especies, los cuales se adhieren irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unos con otros, embebidos en una matriz de EPS, los cuales expresan un fenotipo propio (Donlan & Costerton, 2002; Stewart & Costerton, 2001). Los biofilms son considerados como uno de los modos de vida más exitosos y distribuidos en la tierra (Stoodley et al., 2002) postulándose que en la naturaleza y en las industrias el 99 % de los microorganismos se encuentran formando biofilms y el 1 % vive en estado individual o planctónico (Kragh et al., 2016). A diferencia de la forma de vida libre o planctónica, las células que conforman los biofilms pueden adquirir nuevas características que favorecen la supervivencia y permanencia de aquellos microorganismos que forman parte de esta comunidad (Davey & O'toole, 2000). Estas estructuras constituyen principalmente una estrategia adaptativa para los microorganismos, ya que es un modo protegido de crecimiento, el cual le confiere resistencia y tolerancia a los antimicrobianos y a las condiciones ambientales hostiles (Borucki et al., 2003; Flemming et al., 2016). Vale aclarar que en esta tesis nos referiremos al término “resistencia” para denotar una característica genética hereditaria que se

adquiere por mutación o por intercambio de genes y eso permanece incluso cuando las células se desprenden de los biofilms. Por el contrario, usaremos el término “tolerancia” para denotar una característica que es específica de los biofilms (Brauner et al., 2016; Olsen, 2015) y que se pierde cuando se adopta la forma de vida libre después de la dispersión (Thuptimdang et al., 2015).

En los biofilms se pueden diferenciar tres componentes principales: I) una masa de células microbianas que constituye la parte sólida del biofilm; II) espacios intercelulares o canales, los cuales permiten que los biofilms presenten estructuras tridimensionales y transporten diferentes sustancias en el interior; III) la matriz de EPS, que constituye del 80 al 90 % de los biofilms, siendo su mayor componente el agua. El EPS forma el esqueleto para la generación de la estructura tridimensional y juega un papel fundamental en la adhesión a las superficies y la cohesión (Flemming & Wingender, 2010).

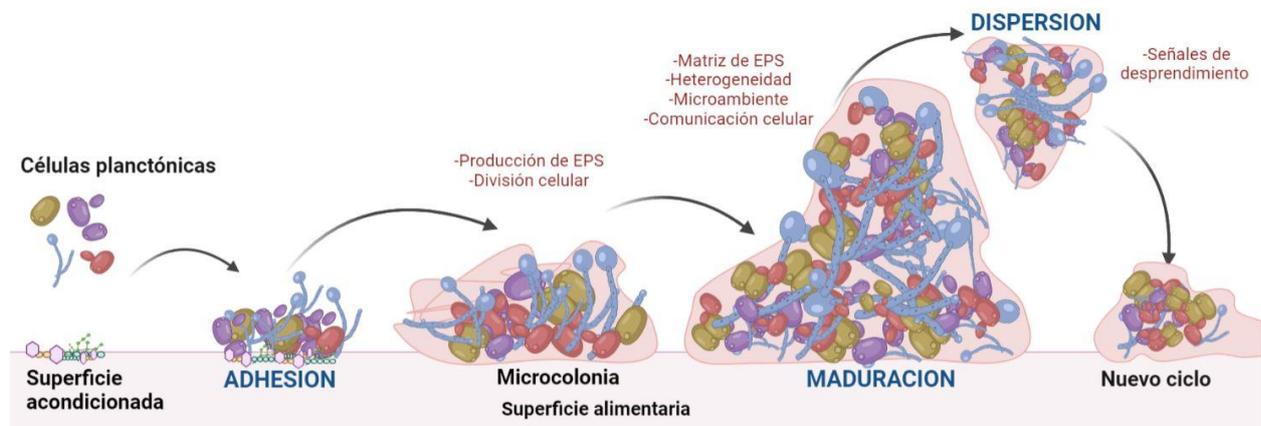
## 1.2 Proceso de formación de los biofilms

El ciclo de vida de los biofilms es un mecanismo complejo e implica diferentes etapas. Entre ellas podemos mencionar:

- 1) Fijación reversible de las células en la superficie;
- 2) Unión irreversible a la superficie;
- 3) Adhesión célula-célula y formación de micro colonias;
- 4) Expansión y maduración del biofilms;
- 5) Desprendimiento de las células, mediante el cual parte de los microorganismos regresan al estado planctónico (**Figura 1**).

La etapa de adhesión es un proceso clave, multifactorial, donde inicialmente las células deben fijarse y adherirse a una “superficie acondicionada” por moléculas orgánicas adsorbidas en la superficie del ambiente circundante, lo cual modifica las propiedades químicas y físicas de la interfase superficie/fluido y la hace accesible a la adhesión. Luego hay un primer estadio reversible que está condicionado por fuerzas de largo alcance (fuerzas electrostáticas, de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas), en el cual las células aún son capaces de abandonar la superficie y volver a su forma planctónica (**Figura 1**). La adhesión depende en gran medida de las propiedades de la superficie: rugosidad, humectabilidad, energía superficial e hidrofobicidad del sustrato (Bohinc et al., 2014; Das et al., 2011). Si se supera la fuerza de repulsión existente entre el sustrato y las células, comienza el segundo estadio irreversible, en el cual las interacciones son de corto alcance y refuerzan su adhesión en el sustrato

(interacciones dipolo-dipolo, uniones hidrógeno, covalentes y no covalentes e interacciones hidrofóbicas) (Flemming & Wingender, 2010).



**Figura 1** Esquema del proceso de formación de biofilms.

Una vez que los microorganismos se adhieren a una superficie biótica o abiótica, comienzan a secretar los componentes de la matriz extracelular, siendo los de mayor relevancia los polisacáridos, las proteínas, los lipopéptidos y el ADN. Los biopolímeros que forman parte de esta estructura son los responsables de la apariencia macroscópica de los biofilms, conocido como *slime*. La composición de la matriz varía según las cepas microbianas, las condiciones de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes (Flemming & Wingender, 2010). A continuación, se detallan algunas de las funcionalidades más importantes de la misma (Fux et al., 2005):

- Adhesión: permite la colonización de las células planctónicas en las superficies bióticas y abióticas y la adhesión a largo plazo del biofilm a la superficie.
- Agregación de las células bacterianas: permite la conexión entre las células, las inmoviliza temporalmente, favorece el desarrollo de altas densidades celulares y el reconocimiento célula-célula.
- Cohesión: forma una red polimérica hidratada que media la estabilidad mecánica junto con cationes multivalentes.
- Retención de agua: mantiene un microambiente hidratado evitando la desecación.
- Barrera de protección: confiere resistencia durante una infección y frente a los agentes antimicrobianos y/o desinfectantes.
- Acumulación de compuestos orgánicos e inorgánicos del ambiente: contribuyendo a la “desintoxicación ambiental” reservando nutrientes del medio y promoviendo la

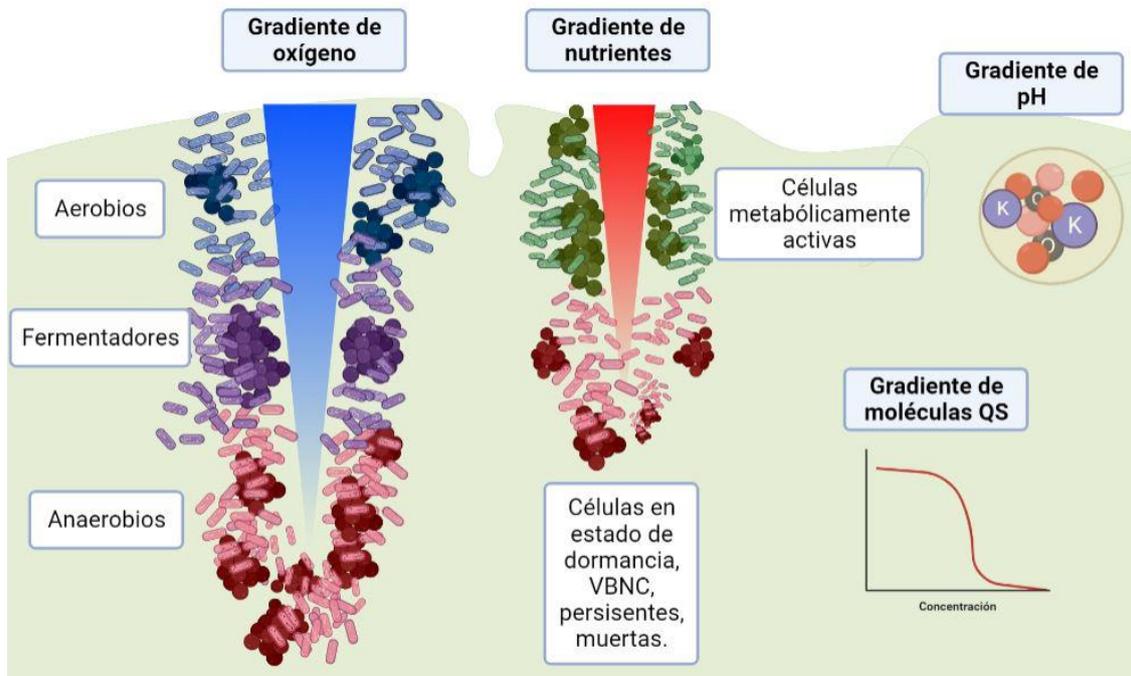
formación de un gel de polisacáridos, el intercambio iónico y de minerales, y la acumulación de iones de metales tóxicos.

—Actividad enzimática: permite la digestión de macromoléculas exógenas para incorporarlas como nutrientes, degrada el EPS permitiendo la liberación de las células desde el biofilm.

—Intercambio de información genética: facilita la transferencia horizontal de genes, lo que contribuye a la resistencia a los antimicrobianos.

—Aceptor y donador de electrones: la actividad redox en la matriz ofrece ventajas en la transferencia indirecta de moléculas pequeñas como el hidrógeno y las enzimas redox actúan en la corrosión influenciada por los microorganismos.

Luego comienza la etapa de maduración, la cual está conformada por el balance entre la multiplicación de los microorganismos y el desprendimiento para la propagación y colonización de nuevos sitios. La morfología resultante del biofilm maduro puede ser suave y plana, rugosa, esponjosa o filamentosa, y también varían en su grado de porosidad, teniendo forma de hongo o macro colonias. Los biofilms constituyen un ambiente heterogéneo, incluso en biofilms monoespecie, y el comportamiento de la población varía pronunciadamente en el tiempo y en el espacio (Monds & O'Toole, 2009; Stewart, 2003). En su interior se observan poros y canales por el cual se mueven los fluidos cargados de nutrientes, y la actividad fisiológica heterogénea de los biofilms produce gradientes nutricionales, de aceptores y donantes de electrones, de pH y redox (Chang et al., 2015) (**Figura 2**). Las diferencias más evidentes entre estos microhábitats se generan en dos zonas: entre las capas celulares localizadas en la base de las micro colonias, es decir, cerca de la superficie de adhesión, y en aquellas expuestas a la fase líquida o a la interfase líquida/gaseosa (Flemming et al., 2016). En la primera capa, cercana a la superficie de adhesión, las células encuentran las mayores limitaciones nutricionales y las propiedades fisicoquímicas más desfavorables, adquiriendo un metabolismo lento y fundamentalmente anaerobio, lo que lleva a que se multipliquen a muy baja velocidad. La segunda capa, en contacto con el medio circundante, corresponde a las zonas bien aireadas y nutridas, pero están más expuestas a condiciones o agentes adversos.



**Figura 2** La formación de la matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS) conduce al establecimiento de gradientes estables que proporcionan diferentes hábitats localizados a pequeña escala. Imagen adaptada de Flemming et al. (2016).

Lo que culmina el ciclo de vida del biofilm es la fase de dispersión activa, en el cual los microorganismos pueden moverse, de manera colectiva, por ondulación (del inglés *rippling*), donde las células o una porción del biofilm parecen moverse por ondas debido a la fuerza del medio líquido circundante; rodando por la superficie y separándose en grupos o individualmente. También por dispersión a través de enjambre y siembra, del inglés *swarming and seeding*. Se pueden desprender unas pocas células o pequeños agregados en la parte superior de los biofilms en el interfaz fluido/superficie; o un fenómeno más significativo es cuando grandes trozos de biofilms se desprenden y se dirigen hacia otra parte de la superficie guiada por la hidrodinámica del sistema, lo que facilita la diseminación de los microorganismos y, por lo tanto, la contaminación (Boudarel et al., 2018; Telgmann et al., 2004; Tolker-Nielsen et al., 2000). De esta manera, las células libres comienzan a dividirse por fisión binaria, donde las células hijas se extienden cerca del sitio de adhesión inicial, formando micro colonias. A medida que las células se dividen, las células hijas se extienden hacia afuera y hacia arriba desde el punto de unión para formar agrupamientos celulares. Así colonizan nuevas regiones de la superficie y comienzan nuevamente el ciclo de formación (Hall-Stoodley et al., 2004; Heydorn et al., 2000).

### 1.3 Comunicación celular: *quorum sensing*

Durante muchos años los microorganismos fueron considerados como organismos no diferenciados y no cooperativos, incapaces de poder comunicarse entre sí. Actualmente, se conoce que han desarrollado sofisticados mecanismos que les permiten detectar y responder a las condiciones ambientales. El mecanismo de regulación más ampliamente conocido e importante vinculado a la construcción, maduración y dispersión de los biofilms es el sistema *Quorum Sensing* (QS) (Waters & Bassler, 2005). Este sistema permite que los microorganismos se adapten a diferentes funciones biológicas, regulándose la expresión de una gran variedad de genes relacionados con el control de procesos celulares.

La manera de regulación empleada en este sistema de comunicación es censando la densidad poblacional celular mediante la acumulación de una molécula señal o también llamada molécula QS (MQS) o auto inductor que se difunde al medio exterior y se une a los receptores moleculares los cuales están localizados en la superficie o en el citoplasma celular. Se consideran cinco criterios para que una MQS sea considerada como tal, esta debe: I) acumularse en el entorno extracelular a lo largo del crecimiento celular; II) alcanzar una concentración proporcional a la densidad de la población celular, cuya influencia se limita a una fase de crecimiento específica; III) como resultado dar una respuesta coordinada a la población; IV) cuando se agrega de forma exógena, esta propague el fenotipo QS correspondiente; V) no ser meramente un subproducto del catabolismo de los microorganismos (Albuquerque & Casadevall, 2012). Las MQS juegan un rol importante en la formación de biofilms y parecen estar involucradas en todas las fases de su formación, regulando principalmente la densidad poblacional y la actividad metabólica para adaptarse a las demandas y a los recursos nutricionales disponibles, participando también en la liberación de los microorganismos adheridos (dispersión), entre otras actividades (Bai & Rai, 2011).

En los biofilms los microorganismos detectan el crecimiento de una u otra especie unida a la superficie, ya sea directamente a través del contacto físico o indirectamente, al detectar la proximidad de ellos. Mediante esta comunicación se garantiza que la respuesta de la población se produzca en un momento adecuado, y la eficiencia de la respuesta depende de la población como tal y no de células aisladas o de grupos pequeños. La respuesta celular de adaptación genera una serie de procesos fisiológicos que a su vez provocan la expresión o supresión de genes específicos, lo cual modifica el fenotipo celular. De esta manera, las células pueden actuar como organismos multicelulares (Padder et al., 2018). Estos procesos resultarían

improductivos y costosos si fueran realizados por una sola célula, pero se vuelven efectivos al ser efectuados por toda la comunidad microbiana.

El sistema QS se ha descrito tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas; las primeras utilizan MQS derivadas de péptidos, mientras que las segundas utilizan derivados de ácidos grasos. Dentro de las bacterias gramnegativas que son patógenas para los humanos y que emplean el sistema QS para la regulación de la síntesis de los factores de virulencia, se encuentran *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, y *Yersinia*. Mientras que bacterias del género *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces* utilizan este mecanismo para el desarrollo de competencia genética, producen péptidos o exotoxinas antimicrobianas e inducen el desarrollo de biofilms (Lazazzera, 2001; Miller & Bassler, 2001; Williams et al., 2007).

Originalmente, se creía que el mecanismo QS era específico de las bacterias. Sin embargo, se ha encontrado que las levaduras coordinan diferentes funciones biológicas a través de este mecanismo QS. Este era un fenómeno relativamente desconocido hasta que Hornby et al. (2001) describió el efecto de una MQS denominada farnesol (FAR), la cual actuaba sobre la morfogénesis de *Candida albicans*, siendo la primera MQS hallada en levaduras. Varios autores han reportado que, por ejemplo, *C. albicans*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. producen compuestos que actúan como MQS, tales como feromonas, FAR, tirosol (TIR), compuestos orgánicos volátiles (3-octano, 3-octanol, 1-octen-3-ol), moléculas con lactona (butiro lactona-I, heptalactona) y lípidos (oxilipinas). Algunas funciones en las que participan las MQS son la diferenciación, regulación del crecimiento, reproducción (sexual o asexual) y producción de metabolitos secundarios (Mehmood et al., 2019).

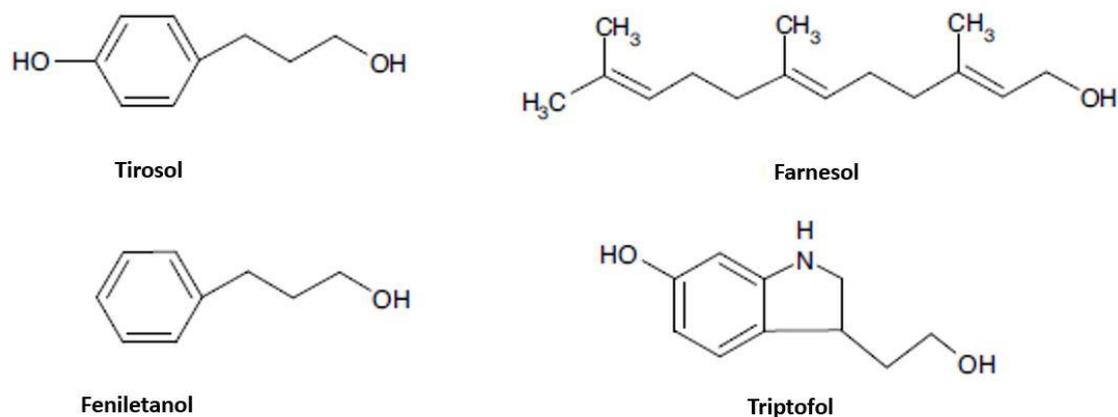
En la **Tabla 1** se exponen algunas de las MQS más reconocidas tanto para bacterias como para hongos.

**Tabla 1** Moléculas de señalización celular que se encuentran con mayor frecuencia en bacterias y levaduras.

Moléculas	Origen microbiano	Referencia
N-acil homoserina lactona	<i>Proteobacteria</i>	(Visick & Fuqua, 2005)
Oligopéptido lineal	Bacterias grampositivas	
Ésteres metílicos de ácido palmítico	<i>Ralstonia solanacearum</i>	
Péptido ComX CSF	<i>Bacillus subtilis</i>	(Pottathil et al., 2008)
Señal de quinolona	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	(Hogan, 2006)
Oligopéptidos ciclados	<i>Staphylococcus aureus</i> y otras bacterias grampositivas	
Farnesol	<i>Candida albicans</i>	(Hornby et al., 2001)
Derivados del Farnesol Tirosol		(Albuquerque & Casadevall, 2012)
a-factor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Sprague & Winans, 2006)

### 1.3.1 MQS en levaduras

En los biofilms, las MQS pueden participar en las fases de adhesión, proliferación, filamentación, maduración y dispersión; regular la morfología celular y la densidad poblacional o secretar de factores virulencia (Deveau & Hogan, 2011; Kruppa, 2009). En levaduras, existen cuatro moléculas principales consideradas MQS: farnesol (FAR), tirosol (TIR), 2-feniletanol (2-FE) y triptofol (**Figura 3**). Se sabe que estos cuatro compuestos tienen un notable efecto en la regulación de la morfogénesis (transición de levadura a hifas y viceversa), en el inicio de la apoptosis fúngica y en la virulencia (Kovács & Majoros, 2020).



**Figura 3** Estructura molecular de las principales moléculas quorum sensing en levaduras.

El FAR (3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrieno-1-ol) es un sesquiterpeno acíclico que se libera como un producto secundario de la vía de biosíntesis de ergosterol, formada por desfosforilación de farnesil pirofosfato, las enzimas para esta vía están codificadas por genes ERG (ergosterol) (Bandara et al., 2012; Dižová & Bujdáková, 2017). Se caracteriza por ser una molécula termoestable, se produce principalmente en condiciones aeróbicas, no es afectado por el pH extremo y no depende del tipo de fuente de carbono o nitrógeno del medio (Hornby et al., 2001; Rodrigues & Černáková, 2020). El efecto de este compuesto es dependiente de la concentración y se necesita un alto acumulo para que actúe sobre levaduras. Se ha detectado en diferentes microorganismos (*C. albicans*, *C. kefir*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *S. cerevisiae*) (Wongsuk et al., 2016) y también es encontrado en muchos aceites esenciales (Weber et al., 2008). FAR, además de actuar en la morfogénesis de las levaduras, regula la apoptosis, la respuesta fagocítica, la hidrofobicidad superficial, el metabolismo del hierro y numerosas etapas del desarrollo del biofilm (Gupta & Foley, 2019; Uppuluri et al., 2007).

El TIR (2-(4-hidroxifenil)-etanol), una molécula derivada de la tirosina que se sintetiza a través de la tiramina o 4-hidroxifenilacetaldehído, es un compuesto antioxidante poderoso (Padder et al., 2018). En el caso de *C. albicans*, se libera en el medio continuamente durante la fase exponencial de crecimiento, acorta la duración de la fase lag, lo que le ofrece una ventaja adaptativa a la levadura. Al mismo tiempo produce la aceleración de la formación del tubo germinal y acelera la conversión morfológica de la forma celular de las levaduras a la filamentosa. Además, la exposición al TIR influye en la regulación del ciclo celular, la replicación del ADN y la segregación cromosómica. En lo que respecta a la formación del biofilm, TIR estimula la producción de hifas en las etapas iniciales (1-6 horas) de adhesión

(Alem et al., 2006; Chen et al., 2004) y suele ser necesaria cuando el FAR está limitado o ausente (Navarathna et al., 2007).

Por último, nos encontramos con 2-FE, un alcohol aromático sintetizado a partir del aminoácido fenilalanina a través de la vía de Ehrlich (transaminación, descarboxilación y reducción) el cual tiene propiedades antifúngicas y antimicrobianas. Su producción depende de la concentración de nitrógeno en el medio y de factores como el oxígeno y pH. Inicialmente, se describió como MQS en *S. cerevisiae* y *C. albicans* y actúa induciendo el crecimiento de pseudohifas (Mehmood et al., 2019; Wongsuk et al., 2016). Cordeiro et al. (2015) la reportó como MQS en *C. tropicalis*, *C. krusei* y *D. hansenii*.

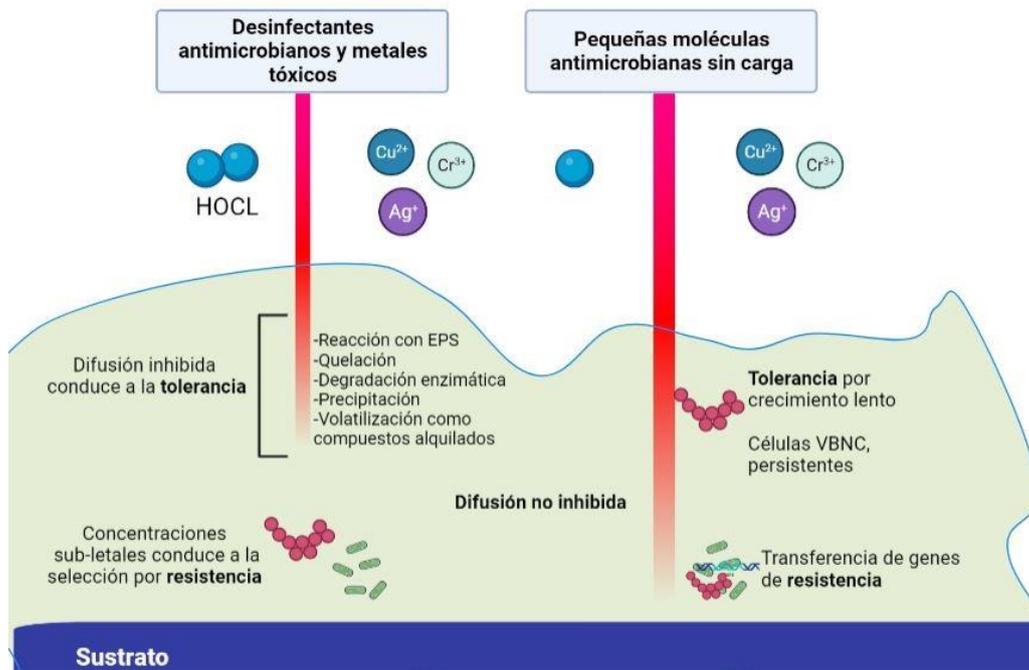
#### **1.4 Problemática de los biofilms**

En la ecología global, los biofilms juegan un rol importante como reservorio de nutrientes en los suelos, océanos, sedimentos, y en muchos casos son utilizados para remediar ambientes en diferentes bioprocesos, como biorremediación, biocontrol, biolixiviación, entre otros (Schachter, 2003). Sin embargo, los biofilms impactan negativamente causando problemas económicos y sanitarios al colonizar una gran variedad de superficies. Por ejemplo, en el sistema de salud son causantes de la contaminación de dispositivos médicos e implantes, líneas de agua de unidades dentales, catéteres y respiradores artificiales, entre otros (de Vos, 2015; Hall-Stoodley & Stoodley, 2002). Para las industrias en general, son los responsables de la bioincrustación o ensuciamiento (del inglés *biofouling*), obstruyen tuberías, intercambiadores de calor, torres de enfriamiento, deterioran la calidad higiénica del agua y provocan corrosión entre otros daños (Flemming et al., 2016). El biofouling es un proceso de múltiples etapas iniciado por el acondicionamiento de la superficie a través de la adsorción de macromoléculas originalmente existentes en el alimento, como proteínas, ácidos húmicos y polisacáridos, y la secreción de EPS por parte de los microorganismos capaces de adherirse y formar biofilms (Guo et al., 2012; Kochkodan & Hilal, 2015).

Los biofilms se han vuelto una problemática a nivel económico y sanitario en una amplia gama de industrias alimentarias, de las cuales podemos nombrar las industrias lácteas (Chmielewski & Frank, 2003; Sharma & Anand, 2002), cárnicas (Sofos & Geornaras, 2010), avícolas (Harvey et al., 2007), pesquera (Bagge-Ravn et al., 2003; Shikongo-Nambabi et al., 2012) en las plantas procesadoras de bebidas analcohólicas, como las jugueras (Brugnioni et al., 2007; Tarifa et al., 2013) y alcohólicas, como las vitivinícolas y cerveceras (Flemming & Ridgway, 2009). Las superficies de la industria alimentaria son colonizadas por microorganismos que pueden proliferar en el alimento en las condiciones de proceso y se convierten en reservorios y fuentes

potenciales de contaminación cruzada en el procesamiento y post-procesamiento de estos, llevando al rechazo del producto, generando pérdidas económicas, comprometiendo la calidad y la seguridad de los alimentos (Coughlan et al., 2016; Khelissa et al., 2017).

Los biofilms representan un problema importante en la industria alimentaria, ya que en su interior los microorganismos cuentan con una barrera protectora que les hace más resistente a la acción de agentes antimicrobianos que se utilizan habitualmente en los procesos de limpieza y desinfección de las industrias alimentarias. La propiedad emergente y alarmante de los biofilms es la gran capacidad para sobrevivir a la exposición de compuestos antimicrobianos, incluidos desinfectantes, metales tóxicos y antibióticos (**Figura 4**) (Flemming et al., 2016). Esta tolerancia y/o resistencia de los microorganismos en biofilms puede surgir por los componentes y la densidad de la matriz de EPS, ya que anulan la actividad de los antimicrobianos por la inhibición de la difusión, o como consecuencia de los estados de crecimiento lento que adoptan muchas células de los biofilms. Por un lado, únicamente los microorganismos que se encuentren en la región más externa del biofilm quedarán expuestos a una concentración letal del producto; aquellos que están más en la parte interna recibirán concentraciones subletales y esto puede conducir al desarrollo de resistencia. Por otro lado, el estado de latencia o baja actividad metabólica que adoptan los microorganismos permite la tolerancia a numerosos antimicrobianos que se dirigen directamente a los procesos metabólicos que ocurren durante el crecimiento (Alvarez-Ordóñez et al., 2019; Bas et al., 2017; Fagerlund et al., 2017).



**Figura 4** Resistencia y tolerancia de los microorganismos en los biofilms a los compuestos antimicrobianos.

## 2. INOCUIDAD ALIMENTARIA Y ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA)

El aumento de la población mundial, la intensificación de la agricultura y la ganadería para satisfacer la demanda de alimentos plantean oportunidades y dificultades para la seguridad de los alimentos. Estas dificultades conllevan una mayor responsabilidad para los productores y distribuidores en cuanto a la inocuidad de los alimentos. Los incidentes locales pueden escalar rápidamente en emergencias internacionales debido a la velocidad y el alcance de la distribución de los productos. En los últimos diez años se han registrado brotes de enfermedades graves en todos los continentes, a menudo amplificadas por la globalización del comercio (OMS, 2020).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados (OMS, 2020). Como los principales vehículos de ETA se han identificado a los productos provenientes de carne bovina, huevos, carne porcina, carne de aves, pescados, crustáceos, moluscos, o productos lácteos. Además, también se reportaron brotes provenientes de frutas y hortalizas. Hasta el momento, se han descrito alrededor de 250 agentes causantes de ETA (Scallan et al., 2015).

Las ETA constituyen un serio problema para la salud pública. Todos los días se reportan casos que incluso pueden llegar a causar la muerte, debido al consumo de agua o alimentos contaminados por microorganismos y/o por las sustancias tóxicas que aquellos producen. Estas representan una grave amenaza para la salud, afectando principalmente a menores de 5 años, mujeres embarazadas, personas inmunosuprimidas y de la tercera edad. Se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas —casi 1 de cada 10 habitantes— por ingerir alimentos contaminados y que 420000 mueren por esta misma causa, con la consiguiente pérdida de 33 millones de años de vida ajustados en función de la discapacidad. Las ETA, además de presentar consecuencias en la salud pública, tiene un importante impacto económico, ya que originan pérdidas millonarias para el sector privado y público (destrucción de stocks, cierre de empresas, pérdidas de horas de trabajo, hospitalización, medicamentos, investigación epidemiológica, indemnizaciones) (OMS, 2020).

En muchos países en desarrollo, la inocuidad de los alimentos suele recibir una mínima atención política de inversión y solo tiende a captar la atención nacional durante los brotes de ETA. Como resultado, muchos países tienen sistemas de inocuidad alimentaria débiles en términos de infraestructura, recursos humanos capacitados, cultura de inocuidad alimentaria y regulaciones aplicables. Aparte de los costos de salud pública y la pérdida de productividad asociada con las ETA, las interrupciones en los mercados de alimentos y los impedimentos a las exportaciones de productos agroalimentarios debido a problemas de inocuidad también presentan un costo. Se calcula que la pérdida de productividad total asociada con las ETA en los países de ingresos bajos y medianos cuesta \$95 200 millones por año, y el costo anual del tratamiento se estima en \$15 000 millones (OMS, 2020).

## 2.1 Agentes asociados a ETA

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020) los principales agentes que se identifican en los alimentos son las bacterias, virus (hepatitis A), parásitos (*Ascaris*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica* o *Giardi*), priones y sustancias químicas (toxinas naturales, contaminantes orgánicos persistentes, metales pesados). Dentro las bacterias, las más importantes son:

- *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* entero hemorrágica, las cuales figuran entre los patógenos de transmisión alimentaria más comunes, a veces con consecuencias graves o mortales.

Los alimentos asociados con los brotes de salmonelosis son, por ejemplo, los huevos, la carne de ave y otros productos de origen animal. Los casos de infección por *Campylobacter* de

transmisión alimentaria son causados principalmente por la ingestión de leche cruda, carne de ave cruda o poco cocinada y agua potable. *E. coli* enterohemorrágica está asociada al consumo de leche no pasteurizada, carne poco cocinada y fruta y hortalizas frescas.

- *Listeria monocytogenes*

Si bien este microorganismo causa una enfermedad relativamente poco frecuente, la gravedad de sus consecuencias para los lactantes, menores, adultos y embarazadas, sitúa a la listeriosis entre las infecciones de transmisión alimentaria más graves. *Listeria* se puede encontrar en los productos lácteos no pasteurizados y en diversos alimentos preparados, y puede proliferar a temperaturas de refrigeración.

- La infección por *Vibrio cholerae* se produce al ingerir agua o alimentos contaminados. Los síntomas incluyen, dolores abdominales, vómitos y diarrea acuosa profusa, que pueden causar deshidratación grave y ser fatal. Los alimentos que están asociados con los brotes de cólera son el arroz, las hortalizas, las gachas de mijo y varios tipos de mariscos.

También dentro de los principales agentes bacterianos encontramos a *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Shigella* sp.

## 2.2 ETA en Argentina

Las ETA forman parte del listado de Eventos de Notificación Obligatoria, en la categoría Transmisibles > grupo Gastroentéricas > evento Toxo-infecciones alimentarias, de acuerdo con el Manual de normas y procedimientos de Vigilancia y Control de Enfermedades de Notificación Obligatoria del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (Ministerio de Salud, 2007). En Argentina, de acuerdo con las fuentes epidemiológicas oficiales, los patógenos de mayor relevancia causantes de ETA son *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. enterica*, *C. perfringens* y *L. monocytogenes* (Fuente: Dpto. de Epidemiología Alimentaria de la DGHYSA, Agencia Gubernamental de Control de la Ciudad de Buenos Aires). Los alimentos de origen cárneo, lácteo, pescados y mariscos constituyen los principales vehículos de transferencia.

En Argentina, debido al alto consumo de los productos cárnicos (listos para consumir y frescos) estos representan los principales vehículos de *E. coli* enterohemorrágica causante del síndrome urémico hemolítico (SUH) (Padola et al., 2004; Rivas et al., 2014; Rivero et al., 2004) y *L. monocytogenes* causante de listeriosis (Pellicer et al., 2002; Rossi et al., 2008).

Según el Boletín Integrado de Vigilancia (N.º 569, SE 39/2021) del Ministerio de Salud de Argentina, los serotipos identificados causantes del SUH en el Laboratorio Nacional de Referencia en el periodo de 2019 y 2020 fueron similares, con prevalencia de O157:H7 (58 %

en 2019 y 48 % en 2020), seguido por O145:NM/H28 (aprox. 25 % en ambos años). Respecto a *Salmonella*, las serovariedades más frecuentes notificadas correspondieron a *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* (con algunas fluctuaciones en el % de la serovariedad) y *S. Paratyphi B*, asociada a fiebre paratifoidea con un alto número de casos en ambos años, siendo del 44 % al 59 %. Se identificaron otras serovariedades menos frecuentes, como *S. Newport*, *S. Infantis* y *S. Typhi* en ambos años.

### 3. LISTERIA

#### 3.1 Generalidades

*Listeria* spp. son pequeños bacilos grampositivos (0,5 a 4 µm de diámetro y 0,5 a 2 µm de longitud), anaerobios facultativos, no esporuladas, pueden estar solas o formando cadenas cortas y no producen cápsula (Meloni, 2014). Están ampliamente distribuidas en el ambiente agrícola, pueden aislarse del suelo, la vegetación, materia fecal, aguas residuales, alimento para animales y en los ambientes industriales (Farber & Peterkin, 1991).

Taxonómicamente, el género *Listeria* se divide en 15 especies, de las cuales solamente *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenas, la primera infecta a los animales y a humanos, mientras que *L. ivanovii* afecta principalmente a los animales y raramente a humanos (Liu, 2006; Meloni, 2014). Considerando los antígenos somáticos (O) presentes en la pared celular y flagelar (H), *L. monocytogenes* puede dividirse en 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7) dentro de los cuales, 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b son los responsables de más del 98 % de los casos de listeriosis en humanos (Jamshidi & Zeinali, 2019). Los alimentos o el entorno de producción de alimentos suelen estar contaminados con los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b. La temperatura óptima de crecimiento de *L. monocytogenes* es de 30 a 37 °C, pero puede sobrevivir entre -0,4 y 45 °C. Además, *L. monocytogenes* tiene la capacidad de crecer en un amplio rango de pH (4,3-9,4), de sobrevivir a altas concentraciones de NaCl (10 % w/v), baja actividad acuosa (0,92), y bajas concentraciones de oxígeno (Jamshidi & Zeinali, 2019; Meloni, 2014).

#### 3.2 Listeriosis

*L. monocytogenes* es la principal causa de listeriosis transmitida por alimentos en humanos. Se estima que 1600 personas contraen listeriosis cada año y que aproximadamente 260 mueren por la enfermedad (CDC, 2017). Existen dos tipos de listeriosis, según sus manifestaciones clínicas: invasiva y no invasiva. *L. monocytogenes* causa listeriosis invasiva cuando el

microorganismo penetra en el revestimiento del tracto TGI y luego establece infecciones en sitios normalmente estériles dentro del cuerpo. La listeriosis no invasiva se produce en personas que no pertenecen a los grupos vulnerables mencionados. Transcurre con síntomas similares a una gastroenteritis (diarrea, fiebre, cefalea y mialgias) o cuadros gripales. La probabilidad que *L. monocytogenes* pueda establecer una infección sistémica depende de factores tales como el número de microorganismos consumidos, la susceptibilidad del huésped y la virulencia de la cepa ingerida. Este tipo de listeriosis afecta a grupos vulnerables, como pacientes inmunosuprimidos, incluyendo aquellos que presentan enfermedades crónicas (cáncer, SIDA, malnutrición), fetos o neonatos (asumiendo que fueron infectados en el útero), pacientes de edad avanzada y con tratamientos con inmunosupresores (ej. pacientes trasplantados) (Codex Alimentarius, 2007; Muñoz et al., 2011). En las personas adultas presenta una mortalidad elevada de hasta el 30 %, manifestándose como bacteriemia o meningoencefalitis secundaria a una bacteriemia. En mujeres embarazadas, puede ocurrir la transmisión transplacentaria del microorganismo provocando una infección intrauterina fetal o provocar un aborto espontáneo según el mes de gestación (Doyle et al., 1987).

### **3.3 Brotes asociados a *Listeria monocytogenes***

Aunque *L. monocytogenes* se describió como un patógeno humano en la década de 1920 (erróneamente se pensó que era la causa de la mononucleosis infecciosa), el primer brote documentado de listeriosis transmitida por alimentos fue en 1979 en Boston (Schlech et al., 1983). Sin embargo, el primer vínculo definitivo de los casos de listeriosis con los alimentos se produjo en 1981 en Canadá y se debió al consumo de repollo contaminado en ensalada de col. A principio de la década de los 80 ocurrieron diferentes brotes, los cuales se asociaron a productos vegetales y productos lácteos. Fue en los años 90 hasta principios de la década de 2000, que se detectaron y confirmaron casos a causa de productos cárnicos y avícolas listos para el consumo (Gahan & Hill, 2005; Schlech et al., 1983).

Hoy en día, *L. monocytogenes* se ha aislado de diversos alimentos como vegetales crudos, leche líquida sin pasteurizar y pasteurizada, quesos (particularmente variedades de maduración suave), helados, mantequilla, aves crudas y cocidas, carnes crudas y procesadas y pescado crudo, en conserva y ahumado. En los últimos años, también han sido reconocidos como fuente relevante de *L. monocytogenes* productos frescos o listos para consumir (del inglés *ready to eat*).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) define como alimentos listos para el consumo a “todo alimento que normalmente se come en estado crudo,

o todo alimento manipulado, elaborado, mezclado, cocido o preparado de otro modo, de forma que normalmente se consume sin someterlo a tratamientos ulteriores” (FDA, 2021). Dentro de estos alimentos se encuentran las verduras, las frutas y los jugos de frutas, cuyo consumo se ha incrementado sustancialmente debido a los cambios de hábitos de los consumidores (Raybaudi-Massilia et al., 2009). A los alimentos listos para consumir se los divide en dos categorías principales: los que favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes* y los que no lo hacen. En un producto listo para consumir que no es compatible con el crecimiento de patógenos, el límite regulatorio para *L. monocytogenes* es de 100 UFC/g, mientras que la tolerancia es cero para los productos que favorecen el crecimiento de este patógeno (Codex Alimentarius, 2007). *L. monocytogenes* puede multiplicarse durante el almacenamiento, aunque esté presente inicialmente en un nivel bajo en un alimento contaminado, incluso a temperaturas de refrigeración. Muchos de los productos listos para consumir que están asociados a la listeriosis incluyen un paso en su producción que se denomina tratamiento listericida (todo tratamiento apropiado que es letal para la *Listeria*). Así, la frecuencia y el nivel de contaminación de estos productos con *L. monocytogenes* se asocia típicamente con la re-contaminación del producto antes del envasado final o por la manipulación posterior a este tratamiento listericida durante la comercialización o el uso doméstico (Codex Alimentarius, 2007). Sin embargo, no todos estos alimentos pasan por este tratamiento; por lo que la seguridad del producto en estos casos depende de las medidas adoptadas durante la producción primaria, el procesamiento y la posterior distribución y uso para minimizar o reducir la contaminación o re-contaminación. Algunos de los brotes reportados por *L. monocytogenes* a nivel mundial ocurrieron en el 2010, se produjeron brotes en Texas por el consumo de apio picado (Gaul et al., 2013); en 2011 por el consumo de melones contaminados en Colorado, (CDC, 2012); en 2014 a causa de manzanas caramelizadas que afectó a 12 estados de los Estados Unidos, a causa de prácticas inadecuadas en el proceso de envasado de las manzanas (Angelo et al., 2017; CDC, 2015); a causa de salmón ahumado en frío y marinado en 2017 en Dinamarca y Francia y en 2018 en Alemania (European Food Safety Authority, EFSA). Entre 2015 y 2018 se reportaron casos en cinco países de Europa (Austria, Dinamarca, Finlandia, Suecia y el Reino Unido) a causa del consumo de vegetales congelados (Sarno et al., 2021).

### **3.4 Adhesión y formación de biofilms**

La capacidad de *L. monocytogenes* para adherirse a diferentes materiales empleados en la industria alimentaria, como superficies de contacto con alimentos ha sido estudiada (Mafu et al., 1990; Sinde & Carballo, 2000). *L. monocytogenes* es capaz de adherirse, colonizar y formar

biofilms en diferentes superficies tales como aluminio, fibras de vidrio (Zhao et al., 2006), polipropileno, vidrio, caucho (Mafu et al., 1990) y acero inoxidable (AI) (Poimenidou et al., 2016), entre otros.

La adhesión de *L. monocytogenes*, así como de cualquier otro microorganismo, facilita la posterior re-contaminación, transfiriéndose fácilmente desde una superficie de contacto alimentario a distintos productos, causando contaminación cruzada entre las superficies y los productos alimenticios (Colagiorgi et al., 2016). Entre los estudios realizados, se ha puesto de manifiesto que la transferencia de *L. monocytogenes* se ve potenciada cuando hay una cierta cantidad de células adheridas y una cierta hidratación del sistema (Vorst et al., 2006). Es por estos motivos que la presencia de *L. monocytogenes* en las plantas de procesado de alimentos es altamente indeseable, ya que además es dificultosa su erradicación de las plantas de producción mediante las técnicas de limpieza y desinfección comúnmente empleadas (Carpentier & Cerf, 2011; Gandhi & Chikindas, 2007).

Debido a la gran problemática que plantea su persistencia para la industria alimentaria, en esta tesis se evaluará la formación de biofilms de *L. monocytogenes*, en presencia o ausencia de otros microorganismos. En las secciones posteriores se desarrollarán los temas relacionados con el ambiente en el cual se estudiarán los biofilms (matriz alimentaria, superficies, presencia de otros microorganismos) y las estrategias de remoción y/o prevención.

## 4. JUGOS DE FRUTAS

### 4.1 Producción de jugos de frutas en Argentina

Argentina es el quinto productor mundial de jugo concentrado de manzana, ubicándose como principal productor del hemisferio sur (Ablin, 2011). La región productora más importante en el país de frutas pomáceas, como las manzanas y peras, se localiza en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, concentran en la actualidad el 90% de la producción de peras y manzanas. Le siguen Mendoza (Valle de Uco), muy lejos con el 10% (Sanchez, 2020). Otras zonas de menor relevancia son 25 de mayo (La Pampa) y el Valle del Tulum (San Juan) (Sanchez & Villareal, 2012). El complejo productivo del sector está conformado por la producción primaria; la clasificación, el acondicionamiento y empaque de la fruta fresca; la conservación frigorífica; el transporte y la comercialización.

En Argentina la fruta que no cumple las exigencias del mercado en fresco es considerada como fruta de menor calidad, y es dedicada a la producción industrial de jugos concentrados (88 %),

para caldo de sidras y sidras (10 %) y el resto (2 %) se reparte entre deshidratados, conservas y otros (Zubeldia, 2007). El jugo constituye un producto básico de bajo valor agregado que se vende mayormente a granel para ser utilizado como insumo por otras industrias alimentarias, ya sea diluyéndolo, mezclándolo o utilizándolo como endulzantes en la fabricación de bebidas gaseosas (Bevilacqua & Storti, 2011; Idigoras, 2014).

En nuestro país, la estabilidad biológica de las modernas plantas productoras de jugos de fruta es muy buena durante el primer año de producción, pero es común observar que comienzan a aparecer problemas de contaminación del producto durante el segundo año a partir de su instalación. Esta situación es causada por la presencia de microorganismos en la materia prima con capacidad de adherirse y proliferar en los accesorios de AI, vidrio y otros materiales que forman parte de los equipos de procesamiento de alimentos.

#### **4.2 Superficies utilizadas en la producción de jugos frutas**

Las superficies de la industria alimentaria son un punto importante de acumulación de restos de materia orgánica, lo que desencadena y favorece la adhesión microbiana (Whitehead & Verran, 2015). Existen superficies que presentan dificultades para la limpieza, ya sea por la presencia de uniones, hendiduras, por la rugosidad, hidrofobicidad, tensión superficial, entre otras características, que los convierte en materiales propensos al anclaje de los microorganismos. A su vez, la adsorción de iones cargados o moléculas orgánicas en la superficie (pre-acondicionamiento) que ocurre cuando la misma entra en contacto con un medio acuoso, por ejemplo, también favorece la adhesión. Particularmente, el jugo de fruta contiene componentes de bajo peso molecular (PM) como azúcares, ácidos, sales, compuestos que dan sabor y aroma. Además, macromoléculas (100–1000 ppm), como polisacáridos (pectinas, celulosa, hemicelulosa y almidón), sólidos en suspensión, partículas coloidales, proteínas y polifenoles, entre otros. Por lo que, la matriz alimentaria es rica en diferentes componentes que pueden modificar las propiedades de las superficies, presentando un efecto favorable para la adhesión microbiana (Bhattacharjee et al., 2017).

Los biofilms pueden formarse sobre todo tipo de superficies (hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas) (Kumar & Anand, 1998), incluyendo plástico, vidrio, madera, metal, y sobre los mismos alimentos (Chmielewski & Frank, 2003). Las diversas propiedades de las superficies empleadas en la industria alimentaria tienen una influencia directa en la adhesión microbiana y la posterior formación de biofilms (Garrett et al., 2008).

Dentro del proceso productivo del jugo de frutas, se encuentra el AI de calidad alimentaria 304 y 316 como una de las superficies más empleadas. En particular, el AI se utiliza ampliamente

como superficie de contacto con alimentos debido a su resistencia mecánica, resistencia a la corrosión y longevidad (Marques et al., 2007).

Como hemos mencionado, los jugos están compuestos por diversas macromoléculas y para que los jugos comerciales puedan ser almacenados durante períodos prolongados, deben pasar por un proceso de clarificación para retenerlas. Hoy en día, los métodos de separación por membrana son ampliamente usados en la industria alimentaria debido a su menor requerimiento de mano de obra, mayor eficiencia y menor tiempo de procesamiento que la filtración convencional (Nunes & Peinemann, 2001). La tecnología de membranas surgió como alternativa a las técnicas térmicas tradicionales empleadas para la clarificación y concentración de los jugos frutas (Bhattacharjee et al., 2017). Las membranas impulsadas por presión se pueden clasificar como microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF), ósmosis inversa (OI) y ósmosis directa (OD) según el tamaño de los poros de la membrana y los mecanismos operativos. Con la MF es posible eliminar sólidos en suspensión, procariotas, levaduras y mohos, mientras que la UF se emplea a menudo para eliminar virus, coloides y macromoléculas. La NF se dirige principalmente a los metales pesados y las materias orgánicas disueltas, y la OI se utiliza para la desalinización, la reutilización del agua y la producción de agua ultrapura (Martin et al., 2016; Pendergast & Hoek, 2011; Ulbricht, 2006).

En la clarificación de jugos de fruta, la UF y la NF son los procesos más comunes, empleándose sistemas de filtración tangencial donde la fuerza impulsora proviene de la diferencia de presión, ocasionando así la separación y/o concentración de las partículas disueltas o suspendidas (Hernandez et al., 1990). A diferencia de los sistemas convencionales, a la UF se la considera dentro de las tecnologías “amigables” con el medioambiente y su uso conlleva ciertos beneficios para el producto alimenticio: la separación se puede realizar sin cambiar la temperatura, por lo que minimiza el riesgo de daño de los alimentos termolábiles así como la pérdida de aromas, no se modifica el pH de la solución, sin agregado de aditivos químicos, menores requerimientos energéticos (en comparación con procesos convencionales como la evaporación y la concentración), reduce los costos de producción y resuelve en parte el problema del tratamiento de los residuos mejorando así la calidad del producto (Urošević et al., 2017). Sin embargo, las membranas presentan algunos inconvenientes críticos, siendo la desventaja principal su susceptibilidad al ensuciamiento debido en parte a su hidrofobicidad (Lee et al., 2016).

#### 4.2.1. Membranas de ultrafiltración

El tipo de membrana que se selecciona es un factor importante para asegurar un buen funcionamiento y un rendimiento óptimo del proceso de UF. La UF tiene un mecanismo de separación basado en el tamaño de poro (0,005-0,1 micrón) y retienen macromoléculas de 20 KD a 250 KD. En el proceso se rechazan los componentes de alto PM, mientras que todos los componentes de bajo PM atraviesan la membrana libremente. Existen diversos tipos de membranas que se adaptan a diferentes usos en función del nivel de filtrado requerido. Los modelos de membranas más habituales son: en espiral (Ghosh et al., 2000), cerámicas, tubulares (Cassano et al., 2007), de fibra hueca (Laorko et al., 2011) y las membranas *plate & frame* (He et al., 2007).

Al mismo tiempo, las membranas de UF (MUF) pueden clasificarse en dos tipos: membranas inorgánicas y membranas poliméricas. Las membranas inorgánicas están formadas por cerámicas o metales, que tienen buena resistividad, y son resistentes a productos químicos corrosivos como ácidos fuertes, bases y oxidantes. En muchas aplicaciones que requieren condiciones ambientales adversas, las membranas inorgánicas son la única opción; las mismas son consideradas superiores en cuanto al mantenimiento que las membranas poliméricas porque son menos vulnerables a la degradación microbiana (Amin et al., 2016). Este tipo de membranas presentan buena resistencia mecánica y tolerancia a la temperatura. No obstante, debido al elevado costo de producción, las dificultades de manipulación y el relativo control insuficiente en la distribución del tamaño de los poros, las membranas inorgánicas son menos habituales. Por su parte, las membranas poliméricas tienen alta adaptabilidad, flexibilidad, buena capacidad de formación de películas, resistencia mecánica, estabilidad química y la transferencia selectiva las hace muy eficientes (Wen et al., 2019). Las membranas poliméricas son muy rentables y se realizan con materiales económicos para su fabricación. Dentro de los polímeros que se utilizan para su fabricación se encuentran: poliéter sulfona (PES), fluoruro de polivinilideno (PVDF), alcohol polivinílico (PVA), cloruro de polivinilo (PVC), poliamida (PA), tereftalato de polietileno (PET), policarbonato (PC), acetato de celulosa (CA), quitosano (CS) (Ulbricht, 2006). En el proceso productivo de jugos clarificados se emplean generalmente membranas tubulares poliméricas de PVDF, las cuales son altamente resistentes a ocluirse al procesar corrientes con grandes cantidades de sólidos en suspensión y/o componentes fibrosos (Tarifa, 2017) (**Figura 5**).



**Figura 5** Proceso de ultrafiltración con membranas de PVDF. Arriba: Imagen del proceso de ultrafiltración. Abajo, recorte de un módulo tubular de usado para la clarificación de jugo de manzana. Fotos tomadas de Tarifa, 2017.

### 4.3 Microorganismos deteriorantes y contaminantes

El ambiente de las industrias elaboradoras de alimentos propicia la presencia de una microbiota heterogénea, lo que permite la existencia de micro consorcios de especies mixtas, que interactúan entre sí, proporcionando microhábitats muy diversos a pequeña escala, favoreciendo la biodiversidad (Bagge-Ravn et al., 2003; Carpentier & Chassaing, 2004; Deveau et al., 2018; Giaouris et al., 2014). Si bien algunas frutas tienen un pH mayor como por ejemplo la banana, el melón, el higo y la papaya, la mayor parte de las frutas son productos de alta acidez. El bajo pH y la naturaleza del ácido orgánico *per se* seleccionan el crecimiento de los microorganismos ácido-tolerantes, tales como mohos y levaduras (Alzamora et al., 2004). Los principales agentes causantes del deterioro microbiológico de la industria de jugos y/o bebidas, pueden ser bacterias, levaduras y mohos (Stratford et al., 2000).

Algunos de los géneros bacterianos reportados como deteriorantes en jugos son *Enterobacter* spp., *Alicyclobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y bacterias del ácido láctico (Brackett, 1994; Chang & Kang, 2004; Walker & Phillips, 2008); ciertos mohos, como *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., (Beuchat, 1992) y otros

autores reportaron la presencia levaduras como *Saccharomyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. etc. (Brugnoni et al., 2007; Jay et al., 2005; Tarifa et al., 2013). Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son las responsables del deterioro primario de jugos de frutas, sin embargo, su número se reduce considerablemente después de los procesos de pasteurización, concentración y refrigeración. En cambio, los mohos y las levaduras toleran altas presiones osmóticas, bajo pH y crecen a temperaturas de refrigeración, siendo los principales microorganismos responsables del deterioro del producto ya procesado (Querol & Fleet, 2006; Tournas et al., 2006).

Particularmente, en las plantas elaboradoras de jugo de manzana se han aislado diferentes especies de levaduras, mohos y bacterias, como se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2** Microorganismos típicos presentes en jugos de manzana (Arthey & Ashurst, 1996)

Levaduras	Mohos	Bacterias
<i>Candida</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Kloeckera</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Leuconostoc</i> spp.
<i>Saccharomyces</i> spp.	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Acetobacter</i> spp.
<i>Torulopsis</i> spp.	<i>Byssoschlamys</i> spp.	<i>Gluconobacter</i> spp.
<i>Rhodotorula</i> spp.		
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.		

Las interacciones entre levaduras y bacterias patógenas en la industria alimentaria plantea un problema económico y sanitario difícil de resolver, debido a que son limitados los tratamientos que se pueden aplicar sin comprometer las propiedades organolépticas y la vida útil de los alimentos (Gálvez et al., 2010).

## 5. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LOS BIOFILMS

Teniendo en cuenta el papel de los biofilms como deteriorantes y como posible reservorio de microorganismos potencialmente peligrosos, se han dedicado grandes esfuerzos para perfeccionar los métodos y estrategias disponibles para removerlos de los ambientes industriales y en desarrollar nuevas herramientas de inhibición y/o reducción más efectivas, económicas y sostenibles en el tiempo. Dentro de los objetivos generales en cuanto al control microbiano en las industrias alimentarias, se encuentran: (1) minimizar la carga microbiana de las fuentes externas al proceso, (2) controlar eficientemente el crecimiento en sitios

microbiológicamente vulnerables y (3) limpiar y desinfectar adecuadamente las líneas de procesado (Maciej Serda et al., 2000). En la industria alimentaria, los biofilms pueden ser eliminados mediante diferentes estrategias que incluyen métodos físicos (campos magnéticos o tratamiento con ultrasonido), químicos (detergentes y desinfectantes) y biológicos, siendo estos últimos los más investigados en la actualidad.

Aunque existen muchos biocidas que se comercializan como efectivos contra el biofouling, solo unos pocos de ellos son adecuados para aplicaciones a gran escala (Xu et al., 2017). Por ejemplo, el hipoclorito de sodio es, de hecho, ampliamente utilizado en la industria alimentaria (Sagong et al., 2011; van Haute et al., 2013), sin embargo, un contratiempo es que las células inmersas en biofilms son muy resistentes a los tratamientos (Xu et al., 2017). Tradicionalmente, el hipoclorito sodio se ha empleado en la industria alimentaria como desinfectante universal (Møretrø et al., 2012), debido a su bajo costo, facilidad de aplicación y alta efectividad microbicida. Sin embargo, con el uso constante de productos similares surge el problema de la resistencia microbiana (Borovec et al., 1998; Cogan et al., 2005; Ramos et al., 2013). Si la limpieza es insuficiente, los residuos de la matriz alimentaria pueden permanecer en la superficie, afectando así a la eficacia del proceso. En los procesos industriales, el diseño geométrico de máquinas, tuberías y tanques suele ser complejo y, por lo tanto, los procedimientos, de limpieza y desinfección son complejos. Además, las células que forman parte un biofilm son más resistentes a los procesos de desinfección convencionales en comparación con las células planctónicas, y por ende, son más difíciles de erradicar (Simões et al., 2010).

Diversos autores han demostrado que una amplia gama de desinfectantes de utilización industrial o sus compuestos activos, no son capaces de inactivar por completo a las principales bacterias patógenas causantes de ETA, y a otros microorganismos que habitan las superficies en biofilms mono o multiespecie (Anand & Singh, 2013; Chylkova et al., 2017; Corcoran et al., 2014; Fagerlund et al., 2017; Martin et al., 2016). El desafío de hoy en día se centra en desarrollar nuevas estrategias capaces de prevenir la formación de biofilms o reducir los biofilms preexistentes de manera eficaz y así evitar la aparición de microorganismos resistentes. En consecuencia, en esta tesis nos centraremos en evaluar dos estrategias de bio control, la primera empleando BAL para mitigar la formación de biofilms de bacterias patógenas alimentarias, y la segunda empleando MQS.

## 5.1 Empleo de bacterias ácido-lácticas

Un punto de investigación actual importante es la colonización deliberada y controlada de los ambientes de procesamiento de alimentos con microorganismos benéficos como las BAL. Estos microorganismos podrían conferir atributos positivos a los productos finales y excluir competitivamente microorganismos patógenos, mejorando así la ecología de las instalaciones de procesamiento de alimentos y, también, inocuidad de los alimentos procesados (Alvarez-Ordóñez et al., 2019). Los métodos antimicrobianos empleados actualmente basados en fuentes microbianas incluyen bacteriófagos, BAL y sus metabolitos (Seal et al., 2018).

Las BAL constituyen un grupo de microorganismos bacilos grampositivos, no móviles, catalasa negativos, ubicuos, productores de ácido láctico, capaces de crecer bajo diferentes condiciones ambientales (Castellano et al., 2004; McLeod et al., 2008; Ringø & Gatesoupe, 1998). Este grupo presenta un gran potencial biotecnológico en salud humana y seguridad alimentaria, ya que pueden aplicarse como biopreservantes y como biocontroladores (Castellano et al., 2017; Gálvez et al., 2014). Debido a una larga historia de aplicación en la industria alimentaria, las BAL han recibido el estatus de “Generalmente Reconocido como Seguro” (del inglés *Generally Recognized as Safe*, GRAS) por la FDA (EE. UU.) y como “Presunción Cualificada de Seguridad” (del inglés *Qualified presumption of safety*, QPS) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Leuschner et al., 2010).

En la actualidad, el uso de BAL se considera como una alternativa adecuada en los sectores industriales para enfrentar a los microorganismos contaminantes/deteriorantes (Gálvez et al., 2014). Se han propuesto diferentes especies de BAL para limitar el crecimiento de bacterias patógenas, entre las principales podemos mencionar a *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. reuteri*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. gasseri* (Alegre et al., 2011; Merino, 2019). En la industria alimentaria, se ha estudiado el empleo de BAL para colonizar superficies y de esa manera contrarrestar la proliferación de otras especies bacterianas (Gutiérrez et al., 2016).

Las BAL podrían inhibir patógenos alimentarios, como *L. monocytogenes*, a través de la competencia (energía y nutrición), la secreción de metabolitos (bacteriocinas, ácidos orgánicos y EPS) y la interferencia con el mecanismo QS (Chen et al., 2018; Deng et al., 2020; Wu et al., 2022). Un enfoque muy prometedor para el control de la formación de biofilms es el uso de BAL para colonizar superficies y así contrarrestar la proliferación de otras especies bacterianas (Falagas & Makris, 2009; Hibbing et al., 2009). Dentro de los metabolitos liberados por las BAL conocidos por sus efectos, encontramos las bacteriocinas, las cuales son péptidos

biológicamente activos producidos por bacterias que tienen propiedades bactericidas contra cepas de la misma especie y otras especies relacionadas (Gómez et al., 2016). Actúan generalmente destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática mediante la formación de poros, lo que ocasiona un desbalance de metabolitos o la disipación de la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Montville & Chen, 1998). Las bacteriocinas producidas por BAL pueden actuar sinérgicamente con otros tratamientos antimicrobianos frente a patógenos alimentarios, gramnegativos y grampositivos. Esto puede reducir la carga microbiana en productos frescos e inactivarlos al causarles a los microorganismos daño celular y desorganización de la membrana celular, haciéndolos más susceptibles a la acción de estos compuestos (Gálvez et al., 2010; Speranza et al., 2020). El ácido láctico es otro de los principales compuestos liberado, además de sustancias de bajo PM (reuterina, reuteriicina, diacetilo, ácidos grasos), peróxido de hidrógeno y compuestos antimicóticos (propionato, lactato de fenilo, lactato de hidroxifenilo y ácidos grasos 3-hidroxi) (Arena et al., 2016; Figueroa-González et al., 2011; Gálvez et al., 2010).

En la actualidad, las BAL productoras de bacteriocinas han sido empleadas sobre superficies de uso alimentario (AI, politetrafluoroetileno, poliestireno) para evitar la proliferación de bacterias patógenas de alimentos (Guerrieri et al., 2009; Pérez-Ibarreche et al., 2016). Al mismo tiempo, se ha señalado que el modo de acción de las BAL frente a los biofilms de microorganismos no deseados es diferente al efecto del empleo directamente de sus bacteriocinas semi purificadas (Camargo et al., 2018). Además, es posible que no solo las bacteriocinas desempeñen un papel en la actividad anti-biofilm cuando se utilizan las cepas BAL, ya que también se pueden producir otros compuestos antimicrobianos (como los biosurfactantes), o estrategias de exclusión para evitar la adhesión (Gómez et al., 2016; Guerrieri et al., 2009). Se ha informado incluso que el EPS de los biofilms de las BAL podría impedir la adhesión y la proliferación de bacterias como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* (Kim et al., 2006).

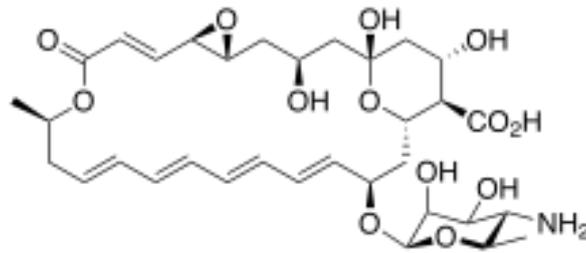
Puesto que la formación de biofilms por bacterias patógenas alimentarias representa un problema para la industria de alimentos, y considerando los posibles usos de BAL para mitigar su presencia, en esta tesis se estudiará el efecto de BAL como antagonistas de patógenos bacterianos.

## 5.2 Natamicina

Actualmente, se han avanzado sobre estudios respecto al empleo de distintos compuestos de origen natural, incluidos varios aceites esenciales, extractos obtenidos de plantas, incluso MQS, alimentos u otros productos derivados, para la inhibición de la formación de biofilms o la remoción de biofilms preexistentes. Algunos de estos nuevos compuestos y extractos ejercen un efecto bactericida directo sobre los microorganismos, mientras que otros muestran actividades indirectas de inhibición de biofilms, relacionadas principalmente con la inhibición de sistemas de QS (Coughlan et al., 2016).

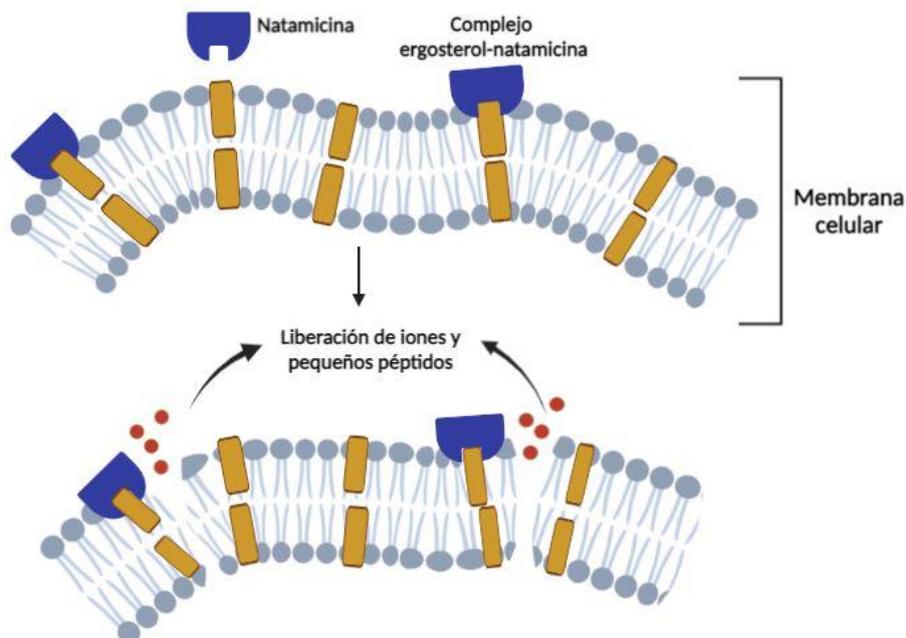
Especialmente en la industria de los jugos se utilizan diversos agentes conservantes sintéticos para la conservación de los alimentos. El benzoato de sodio es bastante popular y se usa comúnmente para conservar alimentos como jugos de frutas, bebidas y alimentos de bajo pH (Berk, 2013). Sin embargo, ha habido una creciente demanda por el uso de conservantes naturales o la producción de alimentos completamente libres de aditivos. En los últimos años, más investigaciones se han focalizado en los aceites esenciales como conservantes y agentes antimicrobianos (Almeida et al., 2019; Karaman et al., 2016).

Un conservante natural que ha despertado un reciente interés debido a su estructura y a su potente poder antifúngico es la natamicina (NAT) (**Figura 6**). La NAT, o primaricina, es un macrólido poliénico, antimicótico, que se obtiene por la fermentación de actinomicetos como *Streptomyces natalensis*, *Streptomyces chattanogenesis* y otras especies estrechamente relacionadas (Tsiraki & Savvaidis, 2014). Dentro de las características de NAT, se puede destacar que es eficaz a bajas concentraciones, no tiene efecto en la calidad de los alimentos, y que tiene una actividad antimicrobiana prolongada en las superficies de los alimentos (Dalhoff, 2017). En soluciones acuosas, su solubilidad es de aproximadamente 40 ppm. Una suspensión que contiene 0,5 % de NAT a pH 6,5 apenas pierde actividad a temperatura ambiente en la oscuridad, lo que demuestra que las suspensiones acuosas neutras de NAT también son muy estables. Presenta una baja solubilidad en agua (40 mg /ml), lo cual es una ventaja para los tratamientos superficiales de los alimentos, ya que asegura que el conservante permanezca en la superficie de los alimentos donde sea necesario, en lugar de migrar hacia el interior de estos y es, por lo tanto, muy eficaz para prevenir la proliferación de levaduras y mohos en dichas superficies (Lule et al., 2015). A valores extremos de pH (alto o bajo), la natamicina es completamente soluble, lo que puede usarse para optimizar/controlar la disponibilidad de NAT activa.



**Figura 6** Estructura molecular de la natamicina.

NAT ha sido ampliamente utilizada para controlar levaduras que se desarrollan en productos como yogur, queso, bebidas sin alcohol, jugos de frutas, condimento para ensaladas, entre otros (El-Diasty et al., 2009; Gallo & Jagus, 2007). El modo de acción de la NAT es a través de su unión al ergosterol, compuesto que está presente en la membrana celular de levaduras y hongos (**Figura 7**). Esto ocasiona la formación del complejo polieno-esterol, lo que altera la permeabilidad de la membrana, inhibe transportadores de membranas de aminoácidos y glucosa dependiente del mecanismo de los esteroides y conduce a la rápida fuga de iones esenciales y péptidos pequeños (Lule et al., 2015; te Welscher et al., 2008).



**Figura 7** Representación del modo de acción de la natamicina sobre la membrana celular.

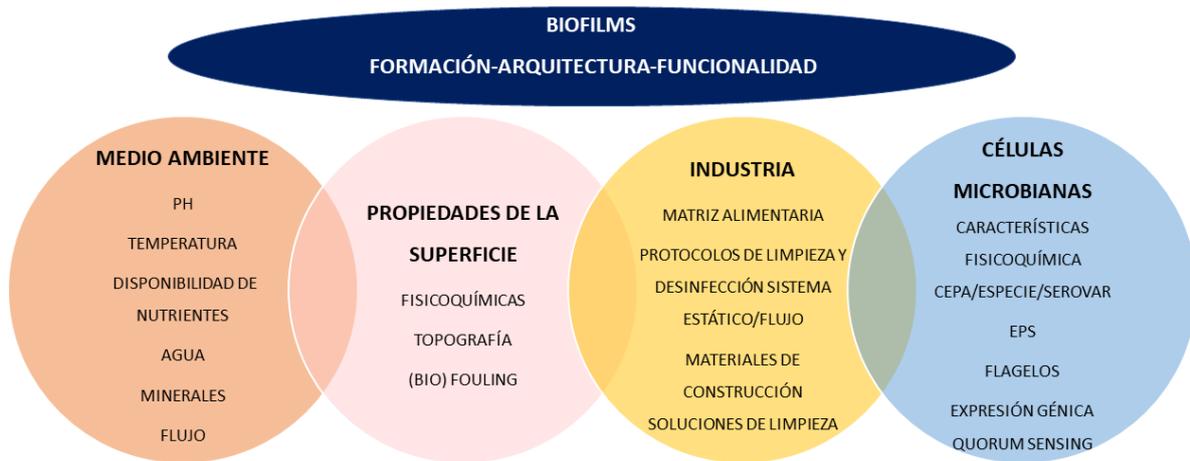
La NAT ha sido probada y aprobada como un conservante de alimentos adecuado y seguro por autoridades en seguridad alimentaria en todo el mundo, incluyendo la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), CODEX/WHO/FAO/JECFA, por la FDA y la Food Standards

de Australia/Nueva Zelanda (FSANZ). NAT se acepta como GRAS y se emplea en la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, Australia, México, Rusia, entre otros (Kallinteri et al., 2013; Lule et al., 2015). En Argentina se permite el uso de la NAT para el tratamiento de cáscara de quesos de pasta dura o semidura o de sus cubiertas protectoras y de las envolturas de embutidos secos que deban sufrir un proceso de maduración. Según la Autoridad Sanitaria Nacional (Código Alimentario Argentino, 2010), la concentración residual en la superficie de las cáscaras o envolturas no deberá ser mayor de 1 mg/dm<sup>2</sup> de superficie de queso o embutido, no debiendo detectarse la presencia del antimicótico en el interior del producto a una profundidad mayor de 2 mm. NAT podrá además ser empleada en los alimentos que específicamente permitan su uso como sustancia antimicótica.

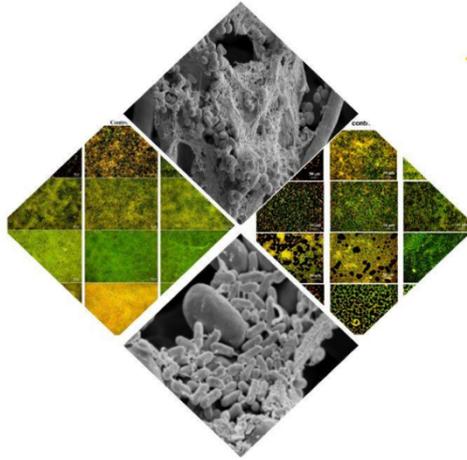
Considerando las características de la NAT y las propiedades del FAR, al cual se lo ha estudiado en combinación con otros agentes antifúngicos o antimicrobianos reconocidos (Bozó et al., 2016; Cordeiro et al., 2015; Katragkou et al., 2015; Kovács et al., 2016; Shanmughapriya et al., 2014), y dado que existen pocos informes sobre la eficacia de los tratamientos antifúngicos combinados con MQS en los biofilms asociados a la industria alimentaria, en esta tesis se evaluará la acción combinada de NAT y FAR biofilms desarrollados en superficies de uso alimentario, a fin de encontrar estrategias alternativas de remoción y/o prevención de biofilms.

Este es un marco introductorio de la compleja problemática de los biofilms en las industrias alimentarias. Como se muestra en la **Figura 8**, hemos observado que el proceso de formación, la arquitectura y la funcionalidad de los biofilms dependen de diversos factores, los cuales tienen un impacto en la diferenciación de los microorganismos y, por ende, en la formación de biofilms (Boudarel et al., 2018; Whitehead & Verran, 2015).

Se considera fundamental comprender el proceso de formación de los biofilms, cómo se asocian e interaccionan las diferentes especies en el microambiente generado en las plantas elaboradoras de alimentos, para poder diseñar estrategias apropiadas para su control, de forma integral, con base en las necesidades propias de las industrias. En consecuencia, en esta tesis nos enfocaremos en evaluar las interacciones que se dan entre las levaduras consideradas como microbiota residente de una planta procesadora de jugo de manzana y las bacterias patógenas productores de ETA, de relevancia en esta industria, sobre superficies de uso alimentario. Además, se identificarán los metabolitos generados en estas comunidades microbianas y se estudiará, en conjunto con las BAL, la posible aplicación como agentes de (bio) control.



**Figura 8** Resumen de los factores que intervienen en la formación del biofilms en la industria alimentaria.



# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

### 6. Medios de cultivos

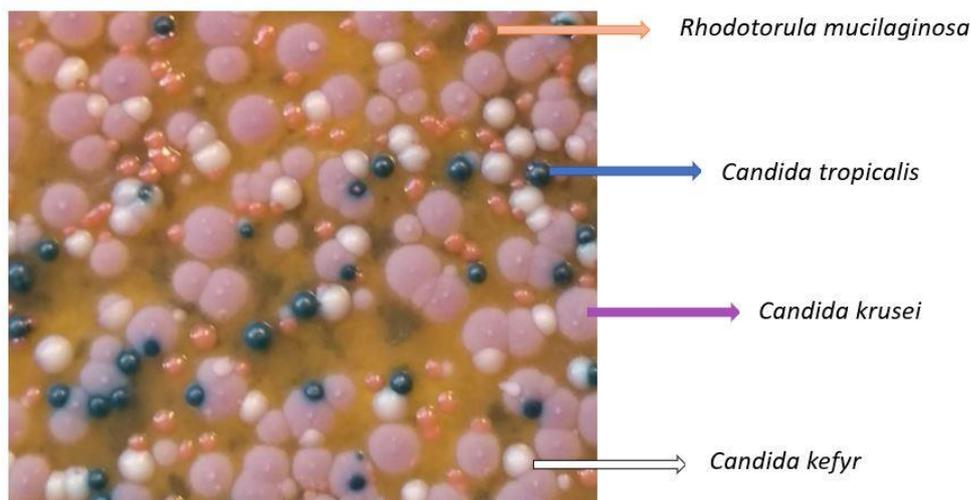
Los medios de cultivos empleados fueron esterilizados a 121°, 1 atm de presión, durante 15 minutos, salvo excepciones detalladas posteriormente. A continuación, se detallará la composición de estos.

**6.1 Agar bismuto-sulfito según Wilson Blair** (BS, Merck, Alemania). Peptona 10,0 g/l, extracto de carne 5 g/l, D-glucosa 5 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g/l, Citrato de bismuto y amonio 1,85 g/l, FeSO<sub>4</sub> 0,3 g/l, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 6,15 g/l, verde brillante 0,025 g/l, agar bacteriológico 15,0 g/l, pH 7,6± 0,2.

Este medio se empleó para el aislamiento, identificación y recuento de *Salmonella*.

**6.2 CHROMagar Candida** (CHROMagar Microbiology, Francia). Peptona 10,2 g/l, cloranfenicol 0,5 g/l, mezcla cromogénica 22,0 g/l, agar 15,0 g/l, pH 6,1 ± 0,2.

CHROMagar Candida está diseñado para el aislamiento selectivo y la identificación de ciertas especies de *Candida* a partir de material clínico, sin embargo, se ha demostrado que es adecuado para el recuento diferencial de levaduras no clínicas y para la estimación de la prevalencia de las especies (Tornai-Lehoczki et al., 2003). Este medio se empleó para el aislamiento, identificación y recuento diferencial de las levaduras (**Figura 9**). Con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento. Las colonias de *C. tropicalis*, presentan color de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei*, rosado claro con borde blancuzco. Es posible que otras especies de levaduras produzcan su color natural. Como observaron previamente Brugnani et al. (2014), las colonias de *C. kefyr* y *R. mucilaginosa* que crecen en CHROMagar son de color blanco y rosa a salmón, respectivamente.



**Figura 9** Colonias típicas de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida kefyr* en CHROMagar *Candida*.

**6.2 E.M.B. agar** (con eosina y azul de metileno, Britania, Argentina). Peptona 10 g/l, lactosa 5 g/l, sacarosa 5 g/l, fosfato dipotásico 2 g/l, eosina 0,4 g/l, azul de metileno 0,065 g/l, agar 13,5 g/l, pH,  $7,2 \pm 0,2$ .

Este medio se empleó para el aislamiento, identificación y recuento de *Escherichia coli* O157:H7.

**6.3 MRS agar** (del inglés *Man, Rose, Sharpe*, Biokar Diagnostics, Francia). Peptona 10 g/l; extracto de carne 10 g/l; extracto de levadura 4 g/l; glucosa 20 g/l, Tween 80 1,08 g/l;  $K_2HPO_4$  2 g/l, acetato de sodio 5 g/l, citrato de amonio, 2 g/l;  $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2 g/l;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0,05 g/l; agar bacteriológico 16 g, pH  $5,7 \pm 0,1$ .

Este medio se empleó para el aislamiento, identificación y recuento de *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei*.

**6.4 Oxford agar base modificado** (OXF, Biokar Diagnostics, Francia). Peptona 23,0 g/l, almidón 1,0 g/l, NaCl 5,0 g/l, esculina 1,0 g/l, citrato de amonio férrico 0,5 g/l, cloruro de litio 15,0 g/l, cicloheximida 400,0 mg/l, sulfato de colistina 20,0 mg/l, cefotetan 2,0 mg/l, fosfomicina 10,0 mg/l, acriflavina 5,0 mg/l, agar bacteriológico 13,0 g/l, pH  $7,0 \pm 0,2$ .

Luego de la esterilización del medio, se le adicionó un Suplemento Selectivo para OXF (colistina 0,005 g y ceftadizimida 0,01 g por vial). El contenido de 1 vial se agrega a 500 ml de medio de cultivo.

Este medio se empleó para el aislamiento, identificación y recuento de *Listeria*.

**6.5 Recuento en placa agar** (PCA, Britania, Argentina). Extracto de levadura 2,5 g/l, tripteína 5 g/l, glucosa 1 g/l, agar bacteriológico 15 g/l, pH  $7 \pm 0,2$ .

Este medio se empleó para el aislamiento y recuento de *Listeria* spp., *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* O157:H7 en los ensayos monocultivo.

**6.6 Caldo Triptona de soja** (TSB, del inglés *Tryptic Soy Broth*). Tripteína 17 g/l, peptona de soja 3 g/l, NaCl 5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/l, glucosa, 2,5 g/l.

Este medio se empleó para el crecimiento de *Listeria* spp., *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7 en medio líquido.

**6.7 Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC, Biokar Diagnostics, Francia)**. Extracto de levadura 5 g/l, glucosa 20 g/l, cloranfenicol 0,1 g/l y agar bacteriológico 15 g, pH 6,6 ± 0,2.

Este medio se empleó para el aislamiento y recuento de levaduras. Para preparar el caldo YGC se utilizaron los mismos componentes con ausencia de agar y este se utilizó para el crecimiento de las levaduras en medio líquido.

## 7. Soluciones y Buffers

**7.1 2-Feniletanol:** (Sigma Aldrich, EE. UU.) PM: 122,16, densidad: 1,020 g/ml a 20 °C, presión de vapor 1 mm Hg (58 °C).

Para los ensayos realizados con 2-FE se prepararon soluciones madre 1/100 en agua bidestilada estéril. A partir de esta solución, se tomó la alícuota correspondiente para alcanzar la concentración requerida.

**7.2 Buffer fosfato salino (PBS):** K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,87 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,68 g/l, NaCl 8,77 g/l, pH 7,5.

**7.3 Natamicina: 50%:** proporcionado por la Ing. Jesica Ostapchuk (Biotec S.A., Buenos Aires, Argentina). PM: 665,733 g/mol.

Para los ensayos realizados con NAT se prepararon soluciones de 2 mg/ml en agua destilada estéril. A partir de esta solución, se tomó la alícuota correspondiente para alcanzar la concentración requerida.

**7.4 Tirosol:** (Sigma Aldrich, EE. UU.) C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>; PM: 138,17 g/mol.

Para los ensayos realizados con TIR se prepararon soluciones madre de 10 mg/l en agua destilada estéril. A partir de esta solución, se tomó la alícuota correspondiente para alcanzar la concentración requerida.

**7.5 Trans-trans Farnesol:** (Sigma Aldrich EE. UU.) 96 %, densidad: 0,87 g/ml a 25 °C; PM: 222,37 g/mol. Para los ensayos realizados con FAR se preparó una solución madre 2/10 en dimetilsulfóxido (DMSO). A partir de esta solución, se tomó la alícuota correspondiente para alcanzar la concentración requerida. La toxicidad del DMSO se evaluó sobre las levaduras.

## 8. SISTEMA DE ESTUDIO

Las condiciones que se adoptarán para la formación de los biofilms en los objetivos planteados reproducirán lo más cercanamente posible el contexto industrial de elaboración de jugos de fruta.

### 8.1 Matriz alimentaria: jugo de manzana

Los estudios se realizaron utilizando como matriz alimentaria jugo de manzana de 12 °Brix obtenido a partir de jugo concentrado clarificado de 72 °Brix proveniente de una industria productora de la región (JUGOS S.A.). Las diluciones se realizaron en agua destilada estéril de acuerdo con la siguiente fórmula (Tarifa, 2017):

$$\text{Vol. } 72 \text{ }^\circ\text{Brix} \times 72 \text{ }^\circ\text{Brix} \times p \text{ (} 72 \text{ }^\circ\text{Brix)} = \text{Vol. } 12 \text{ }^\circ\text{Brix} \times 12 \text{ }^\circ\text{Brix} \times p \text{ (} 12 \text{ }^\circ\text{Brix)}.$$

Siendo:

Vol. 72 °Brix: volumen de jugo de manzana concentrado de 72 °Brix que debe utilizarse

Vol. 12 °Brix: volumen de jugo de manzana de 12 °Brix que desea obtenerse

p: densidad del jugo de manzana (p: jugo de manzana 12 °Brix= 1,04 g/ml, p: jugo de manzana 72 °Brix= 1,36 g/ml, aproximadamente).

En cada ensayo el jugo de manzana preparado fue esterilizado por microfiltración con membranas de un tamaño de poro de 0,45 µm (Metricel®Grid, GelmanSciences, MI, EE. UU.). La variedad de la fruta, el origen, las condiciones de cultivo, el procesamiento y el almacenamiento determina la composición del jugo de fruta (Lee & Mattick, 1989). La composición media del jugo de manzana de 12 °Brix se detalla a continuación, expresado como g/l (Lozano, 2006).

Fructosa 70

Glucosa 35

Sacarosa 16

Ácido málico 0,4 – 3,4

Ácido cítrico < 1

Ácido ascórbico < 0,04

Potasio 1

Calcio 0,05 – 0,4

Fósforo 0,07 – 0,1

Sodio 0,02

Aminoácidos libres 1 – 5

pH:  $3,5 \pm 0,2$

Fuerza iónica: 0,023 mol/l

## 8.2 Superficies de uso alimentario

Las superficies son un punto importante de acumulación de restos de materia orgánica, los cuales desencadenan y favorecen la adhesión, proporcionándoles una fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos, incluidos patógenos y alterantes (Whitehead et al 2010).

A lo largo de esta tesis se utilizaron dos superficies como soportes para los ensayos de adhesión y formación de biofilms:

- acero inoxidable (AI) de calidad alimentaria AISI 304-316 (rugosidad media: 0,064  $\mu\text{m}$ );
- membranas de ultrafiltración (MUF) de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 100 KDa de cut-off (Synder Filtration, Vacaville, CA, EE. UU).

Los segmentos de AI (1x1  $\text{cm}^2$ ) se lavaron durante 15 min con una solución de detergente neutro al 2 % (Extran MA 02 neutral, Merck) y se enjuagaron con agua destilada a 50 °C. Luego, se esterizaron en autoclave durante 15 min a 121 °C.

En caso de las MUF, se utilizaron hojas planas, las cuales se cortaron con tijeras y pinzas estériles, obteniendo secciones de 1x1  $\text{cm}^2$  mediante el empleo de una regla. Siguiendo las recomendaciones de fábrica, las secciones de MUF se lavaron con agua destilada solamente previo a su uso para remover preservantes y otros tipos de materiales indeseados que podrían estar adheridos en ella. Para ello, colocamos las membranas ya recortadas en tubos de ensayos con agua destilada estéril y se vortexearon aprox. 30 seg.

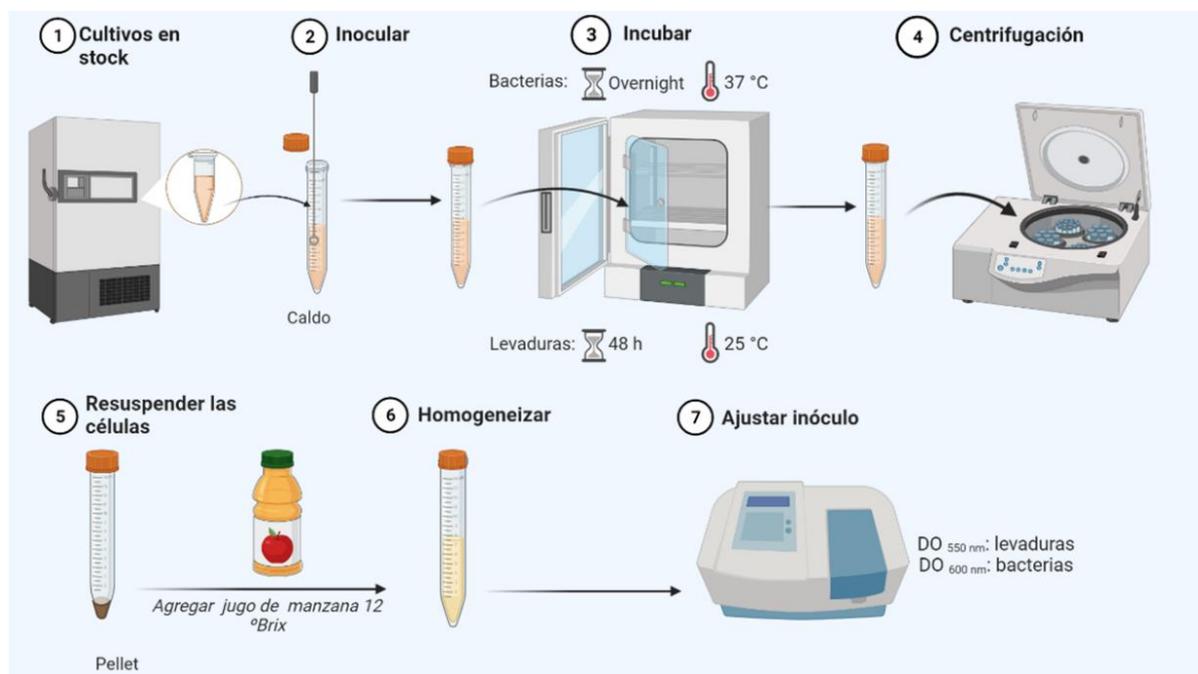
Para la formación de los biofilms, ambas superficies se colocaron en microplacas de 24 pocillos estériles, y luego se les adicionó el cultivo correspondiente (se detallará en la sección siguiente).

Las condiciones del sistema (superficies a evaluar, matriz alimentaria, temperaturas y tiempos de incubación) se seleccionaron con el objetivo de simular lo más cercanamente posible los microambientes que se generan en la industria productora de jugo de manzana.

## 9. MICROORGANISMOS EMPLEADOS

En la **Figura 10** se esquematiza la preparación de las suspensiones empleadas en este estudio. Los microorganismos utilizados en esta tesis fueron conservados en tubos Eppendorf con

glicerol al 20 % (v/v) a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A partir de este stock, los cultivos se re suspendieron en los medios líquidos correspondientes (sección 6) y se incubaron en estufa por 48 h a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  las levaduras y por 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  las bacterias. Posteriormente, las células se separaron por centrifugación (Labofuge 200, Kendro, Alemania) a  $5000\text{ x g}$  durante 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS. El pellet resultante fue re suspendido en jugo de manzana estéril de 12  $^{\circ}\text{Brix}$  y las suspensiones fueron ajustadas con un espectrofotómetro de luz visible a una  $\text{DO}_{550\text{ nm}}$  0,125 que representa aprox.  $10^6$  células/ml para las levaduras. En caso de las bacterias, el ajuste se realizó a una  $\text{DO}_{600\text{ nm}}$  de 0,250 (aprox.  $10^8$  células/ml). Para algunos ensayos, el ajuste del inóculo se efectuó en medios de cultivos líquidos específicos; las condiciones de obtención de estos se detallarán en cada caso particular.



**Figura 10** Esquema general de preparación y ajuste de los inóculos.

## 9.1 Levaduras

Se utilizaron cuatro levaduras aisladas de los accesorios de producción (superficies internas de equipos y sistema de UF) de industrias elaboradoras de jugo de manzana y pera: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida kefyr* consideradas como representantes de la microbiota residente (Brugnoni et al., 2007; Tarifa et al., 2013).

Dos tipos de cultivos se prepararon según las necesidades de las experiencias: cultivos monoespecie de levaduras y mezcla de levaduras. En esta tesis, nos referiremos a cultivo *monoespecie* cuando se trabaje con una especie en particular, y como *mezcla de levaduras*

cuando se trabaje con la combinación de las cuatro especies. Para este último caso, se tomaron alícuotas iguales de cada suspensión de las levaduras ajustadas (véase sección 9) y se mezclaron en una proporción 1:1:1:1.

## 9.2 Bacterias patógenas

Las bacterias patógenas que se estudiaron pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos de la Universidad Nacional del Sur: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (serotipo 1/2c), *Salmonella enterica*, subespecie *enterica* serovariedad Enteritidis (*Salmonella enterica* a partir de ahora) y *Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933).

Para comprender el comportamiento de *L. monocytogenes* en alimentos y entornos de procesamiento de alimentos, en experimentos de laboratorio se recomienda el uso de un organismo sustituto. Debido a su estrecha relación genética, *L. innocua* se ha utilizado a menudo como sustituto de *L. monocytogenes*. Se sabe que *L. innocua* forma biofilms sobre los materiales empleados en la industria alimentaria y ha sido encontrada en los mismos nichos ambientales que *L. monocytogenes*, además de ser aislada de los mismos alimentos; es por lo que ha sido empleada como microorganismo sustituto de *L. monocytogenes* (Lappi et al., 2004; Milillo et al., 2012). En el Capítulo I se trabajará con la bacteria no patógena de *L. innocua* (aislada de un queso de pasta blanda).

Con el fin de recrear un ambiente similar o acercarnos a lo que ocurre cuando las bacterias se encuentran en condiciones de estrés, en determinados ensayos se trabajó con las bacterias pre adaptadas en jugo de manzana. El uso de células estresadas o previamente adaptadas podría revelar información más realista que el uso de cultivos en crecimiento exponencial no sometidos a condiciones de estrés. Para esto, las cepas patógenas, previo al ajuste del inóculo, se expusieron a jugo de manzana durante 4 h a 25 °C (Tarifa et al., 2015). Luego se centrifugaron y se re suspendieron nuevamente en la matriz alimentaria para ajustar el inóculo correspondiente.

## 9.3 Bacterias del ácido láctico (BAL)

Para los estudios correspondientes a la búsqueda de estrategias de biocontrol se evaluaron dos BAL las cuales pertenecen a la American Type Culture Collection (ATCC): *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, y *Lactobacillus casei* ATCC 393. Sobre la base de estudios de la secuenciación del genoma de *Lb. rhamnosus*, se realizó una reclasificación y se le asignó el nombre de *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Zheng et al., 2020). Sin embargo, dado que el

nombre no había cambiado en el momento en que se realizaron los estudios de esta tesis, aquí nos referiremos como *Lb. rhamnosus*.

En los ensayos realizados, se utilizó caldo MRS para los cultivos de BAL y después se siguieron los pasos explicados en el apartado 9. En todos los ensayos en el cual se emplearon las BAL, el inóculo se ajustó a una  $DO_{600}$  hasta obtener una concentración final de  $10^8$  UFC/ml.

## 10. FORMACIÓN DE BIOFILMS

Se plantearon diferentes escenarios posibles para el estudio de la adhesión y el desarrollo de los biofilms. Se consideraron cuatro combinaciones entre los microorganismos, ya sean bacterias y/o levaduras, y dos formas de colonización de la superficie (**Figura 11**).

Se evaluaron las siguientes combinaciones entre los microorganismos:

10.1.1 **Monoespecie:** la adhesión es a partir de un monocultivo, se evalúa la adhesión por separado de cada bacteria o cada levadura.

10.1.2 **Mezcla de levaduras:** adhesión de la mezcla de las cuatro levaduras.

10.1.3 **Duales:** adhesión de una levadura + una bacteria patógena o BAL + bacteria patógena.

10.1.4 **Multiespecie:** adhesión de la mezcla de levaduras + una bacteria (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *S. enterica* o *E. coli* O157:H7).

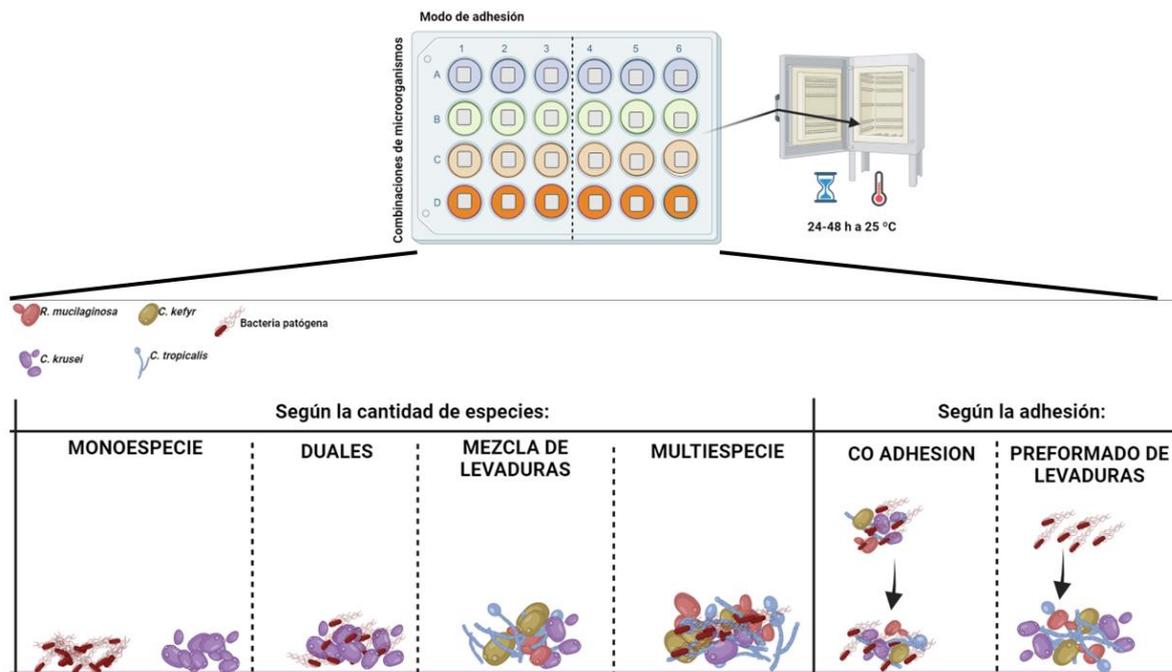
Se refiere a cultivos planctónicos (CP) cuando las especies se encuentra como células libres.

Por otro lado, según el modo de colonización de la superficie:

10.1.5 **Co-adhesión:** cuando la colonización de la superficie se da de manera simultánea por parte de las bacterias y las levaduras.

10.1.6 **Preformado:** en el cual las bacterias encuentren una superficie ya colonizada por las levaduras (puede ser una sola o la mezcla de levaduras) o cuando encuentran una superficie colonizada por BAL.

No se contempla, en cambio, la incorporación de levaduras a biofilms formados por patógenos, asumiendo que esta es la casuística menos probable en base a las frecuencias poblacionales microbianas presentes en la industria procesadora de jugos de fruta.



**Figura 11** Representación esquemática de las combinaciones de microorganismos evaluadas según la cantidad de especies y el modo de adhesión. En el caso de los estudios con BAL (no representados en la figura) se evaluaron las adhesiones monoespecie y formando duales con las bacterias patógenas y los dos modos de adhesión.

Todas las muestras se incubaron en condiciones de no circulación de fluidos a 25 °C. En los procesos industriales el diseño y la geometría de los equipos es variado y complejo, por lo que los biofilms se desarrollan bajo una amplia distribución de fuerzas hidrodinámicas (Blel et al., 2007; Lelièvre et al., 2002). Los biofilms constituidos bajo condiciones estáticas se consideran representativos de aquellos formados en tanques donde se realizan los procesos de clarificación enzimática y de almacenamiento y accesorios de cañerías que pueden presentar puntos donde se modifica la circulación de fluidos, como codos, curvas, tramos en T, etc. (Tarifa, 2017). Los tiempos de incubación evaluados serán aclarados según corresponda en cada sección.

## 11. ESTUDIO DE LOS BIOFILMS MEDIANTE LA TÉCNICA DE RECuento

Para extraer microorganismos de una superficie, se debe seleccionar una técnica de recuperación que garantice la recuperación máxima de células cultivables (bacterias y levaduras) para evitar lecturas falsas y, de esta manera, minimizar la variabilidad en los ensayos. A lo largo de esta tesis, se ha propuesto una técnica que combina sonicación de las muestras, el cual ha sido empleado previamente por otros autores (Tang et al., 2009; Zips et

al., 1990), seguido de la agitación con vórtex (Lindsay & von Holy, 1997) en presencia de perlas (Montañez-Izquierdo et al., 2012).

Las superficies de AI y MUF, que contenía los biofilms, se lavaron con agua destilada estéril dos veces y se las agitó suavemente con el fin de eliminar las células no adheridas. Las muestras se retiraron de la microplaca con una pinza estéril y se colocaron en un tubo de ensayo que contenía agua destilada más 5 perlas de vidrio de 5 mm diámetro. Seguidamente, las muestras se sonicaron 2 min a 20 °C (Digital Ultrasonic Cleaner, PS-10A), seguido de 1 min de agitación a máxima velocidad con vórtex. Luego se realizaron las diluciones seriadas correspondientes con agua destilada estéril y los recuentos con la técnica de agar volcado para aquellos que provenían de un monocultivo, o mediante diseminación en superficie en los medios selectivos y diferenciales correspondientes para aquellos que provenían de cultivos de más de una especie (biofilms duales o multiespecie). Todos los resultados se expresaron como UFC (Unidades Formadoras de Colonias) /cm<sup>2</sup>.

## **12. ESTUDIO DE LOS BIOFILMS MEDIANTE TÉCNICAS MICROSCÓPICAS**

En la actualidad se encuentran disponibles numerosas técnicas y herramientas de imágenes para el análisis de la arquitectura de los biofilms que pueden representar características estructurales de la comunidad sésil (Cattelan et al., 2018). Dentro de las herramientas más utilizadas podemos encontrar microscopías ópticas como de transmisión y de fluorescencia y las llamadas de alta resolución como ser la microscopía electrónica de barrido (del inglés *Scannig Electron Microscopes*, SEM), microscopía de fuerza atómica y microscopía de láser confocal (Pousti et al., 2019). En nuestro estudio se observaron las muestras mediante microscopía de fluorescencia y SEM.

### **12.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

La adquisición de imágenes tridimensionales permite un análisis del desarrollo del biofilms y brinda mayor conocimiento de las características estructurales de la comunidad sésil (Cattelan et al., 2018). Entre las técnicas utilizadas para detectar la formación de biopelículas, la microscopía electrónica está mejor indicada para evaluar la interacción microbiana en la matriz de biofilms (Lewis et al., 1987; Tortorello & Gendel, 1997) y es una herramienta extremadamente útil para análisis comparativo en la investigación de biofilms, especialmente al evaluar los efectos anti-biofilm de un compuesto/tratamiento (Azeredo y col., 2016).

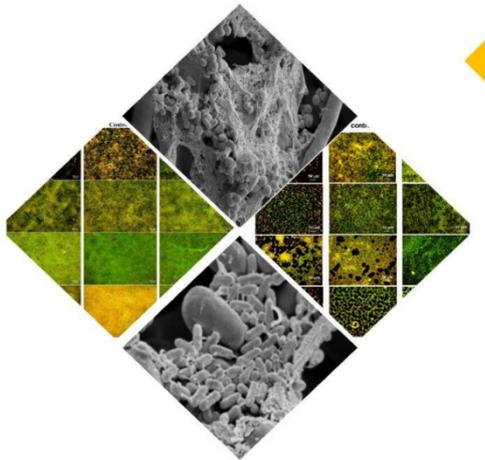
Para analizar las muestras, estas se enjuagaron y luego se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,2), se lavaron tres veces con el mismo buffer y luego se les realizó punto crítico (E3000, Polaron). Las muestras se cubrieron con oro (300 Å) y se observaron con un microscopio electrónico de barrido (LEO EVO 40, Cambridge, Inglaterra) en el Centro Científico Tecnológico perteneciente al Servicio de Nacional de Microscopía, Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina).

## 12.2 Microscopía de Fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una de las más empleadas por su alto grado de sensibilidad y especificidad. Este análisis proporciona información sobre la construcción y morfología del biofilms sin alterar la estructura física de la película. Esta microscopía también puede usarse para determinar o estimar la cobertura de superficie total y el volumen, incluida la matriz de EPS (Wilson et al., 2017). Las bacterias y células se pueden marcar con fluorescencia mediante el uso de fluorescente o ser marcado con algún reportero genético fluorescente (Darsonval et al., 2021). Dentro de las tinciones más empleadas podemos nombrar aquellas útiles para sondear viabilidad celular como el kit vivos muertas, que se basa en la integridad de la membrana celular y la actividad metabólica. En nuestro caso, después de la incubación de la muestra, las superficies se enjuagaron dos veces con agua estéril para eliminar las células no adheridas y se tiñeron con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD *BacLight* (Molecular Probes, Eugene, OR). El kit consiste en una mezcla de dos colorantes que se unen a los ácidos nucleicos: SYTO 9 e ioduro de propidio (IP). Ambos difieren tanto en sus características espectrales como en su capacidad de penetración a las células viables. SYTO 9 tiñe las células de verde, mientras que el IP penetra en las células cuya membrana celular ha sido dañado, tiñéndolas de rojo. Ambos componentes se mezclaron en cantidades iguales (1,5 µl + 1,5 µl), se diluyeron en agua destilada (1000 µl) y vortexearon, todo en condiciones de oscuridad. Para cubrir la superficie de AI se utilizaron 10 µl de la mezcla y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente 20 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua destilada para eliminar los residuos de los colorantes. Los biofilms fueron observados mediante un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, Primo Star, Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara Carl Zeiss (AxioCam ERc5s). Posteriormente, las fotografías se analizaron con un software para imágenes de microscopía (ZEN Core 3.4 blue edition, Carl Zeiss).

### 13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se hicieron por triplicado, en los casos posibles las mismas se efectuaron a la par para reducir la variabilidad debido a factores extrínsecos. Los resultados se expresaron como media±desvío estándar (DE). Los datos se analizaron empleando el modelo de ANOVA (análisis de la varianza) seguido de la prueba de Tukey cuando fue apropiado para la comparación de medias. Se empleó el software GraphPad InStat (Version 3.06, Software Inc 2003) y GraphPad Prism (Version 5.00, 2007) para la realización de gráficos. Se consideraron como resultados estadísticamente significativos aquellos con un nivel de confianza igual o mayor al 95 % ( $p \leq 0,05$ ). Las diferencias significativas se expresaron del siguiente modo diferencias no significativas (ns)  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



# CAPITULO I

BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A BROTES EN FRUTAS Y  
DERIVADOS: IMPACTO DE LA MICROBIOTA RESIDENTE EN LA  
FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE ACERO INOXIDABLE Y MEMBRANAS  
DE ULTRAFILTRACIÓN

## CAPITULO I. BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A BROTES EN FRUTAS Y DERIVADOS: IMPACTO DE LA MICROBIOTA RESIDENTE EN LA FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE ACERO INOXIDABLE Y MEMBRANAS DE ULTRAFILTRACIÓN

### HIPÓTESIS

- Las interacciones entre patógenos alimentarios, asociados a brotes en frutas y derivados, y las levaduras que forman parte de la microbiota residente de las superficies de equipos de producción, favorecen la persistencia del patógeno mediante la asociación en biofilms.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar y comparar la hidrofobicidad, movilidad, producción de EPS, autoagregación, supervivencia y adhesión sobre acero inoxidable (AI) de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* utilizando jugo de manzana como matriz alimentaria.
- Estudiar la adhesión de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefyr* en membranas de ultrafiltración (MUF).
- Evaluar la capacidad de formación de biofilms de *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 con las levaduras asociadas a las industrias productoras de jugos de frutas sobre AI y MUF.
- Estudiar las variaciones en la composición celular y la arquitectura de las comunidades resultantes.

## INTRODUCCIÓN

A pesar de los grandes esfuerzos realizados para reducir las contaminaciones alimentarias provocadas por *L. monocytogenes* en la última década, los brotes recientes en mantequillas, carne cocida, paté, manzanas caramelizadas, entre otros, indican que tal problema no ha sido resuelto (Glass et al., 2015; Goulet et al., 2006; Okutani et al., 2004; Olsen et al., 2005; Rocourt et al., 2000). En particular, la tasa de incidencia de brotes de ETA causada por el consumo de jugos ha mostrado una tendencia creciente en los últimos años, lo que demuestra que los microorganismos han desarrollado mecanismos para resistir diversos factores de estrés. Se han reportado numerosos brotes a nivel mundial de jugos de frutas entre los años 2005 y 2020, especialmente en jugo de manzana (16 brotes) y en jugo de naranja (2 brotes) (Alonzo, 2013; Cheng et al., 2003; Krug et al., 2020). *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 han sido declarados como patógenos de interés para la inocuidad de jugos de manzana y otras frutas (FDA, 2004). Si bien no existen reportes que asocien a los jugos de frutas con brotes de listeriosis, *L. monocytogenes* se ha aislado de jugo de manzana no pasteurizado (pH 3,78) y de una mezcla de jugo de manzana y frambuesa (pH 3,75) (Sado et al., 1998). Uno de los brotes de listeriosis menos esperados se relacionó con el consumo de manzanas recubiertas de caramelo en Estados Unidos en 2014, un vehículo no reportado previamente para *L. monocytogenes*. Se ha confirmado que, en vista del brote, varias superficies que entran en contacto con la fruta, como cepillos para pulir o para secar, cintas transportadoras y la superficie interior de los contenedores de madera, resultan positivas para *L. monocytogenes* (Angelo et al., 2017). Hasta ese momento, no se habían reportado informes que sugirieran que *L. monocytogenes* era un patógeno asociado rutinariamente con las manzanas (Glass et al., 2015).

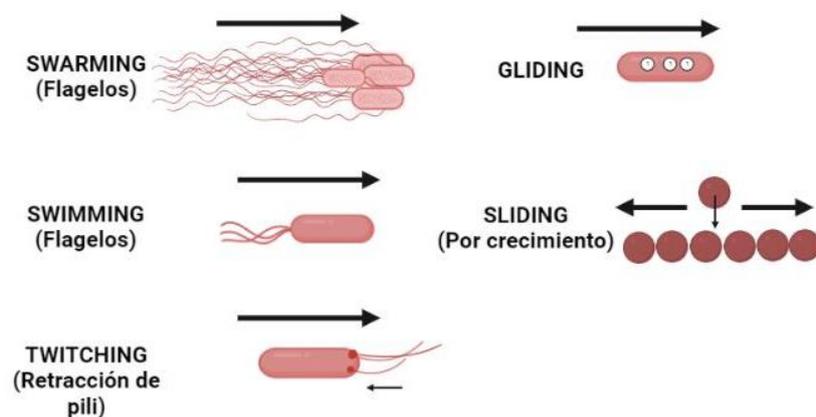
La FDA (2004) define el jugo como un líquido acuoso que se extrae de una o más frutas y/o vegetales, o bien como cualquier concentrado de dicho líquido. Por otro lado, el jugo concentrado es aquel que, una vez extraído de la fruta y/o vegetal, sufre un proceso de reducción de peso y volumen mediante la remoción de la porción acuosa. Para obtener el jugo clarificado, el jugo se somete a un proceso de ultrafiltración por membranas, generalmente de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Mohammad et al., 2012). La UF permite la obtención de jugos exentos de sedimentos y turbidez, lo que supone un ahorro en costes operacionales y materiales, así como una reducción de los productos residuales, lo que a su vez contribuye a mejorar la calidad del producto (organoléptica y microbiológicamente) (Scott, 1998). No obstante, a medida que transcurren los ciclos de producción, se van depositando sobre las

superficies de las membranas diversos materiales de origen inorgánico, orgánico y/o biológico, lo cual provoca el proceso de ensuciamiento o fouling (Flemming, 1997). El *biofouling* es uno de los problemas operativos más graves de los sistemas de UF basados en membranas y es más riesgoso que otras formas de ensuciamiento debido a la capacidad de los microorganismos para crecer, multiplicarse y propagarse sobre la superficie de la membrana (Tang et al., 2009), facilitando el establecimiento de poblaciones de patógenos de riesgo para la salud humana en las MUF (Kochkodan & Hilal, 2015).

En estudios anteriores del grupo de investigación, se determinó que los principales agentes del biofouling eran levaduras, y las especies de levaduras identificadas mostraron resiliencia frente a los sucesivos factores de control y estrés aplicados en las diferentes etapas de producción (Brugnoni et al., 2007, 2011, 2012; Tarifa et al., 2013). Entre las especies identificadas, once aislamientos de levaduras pertenecieron a seis especies: un aislamiento de *R. mucilaginosa*, tres aislamientos de *C. krusei*, dos aislamientos de *C. tropicalis*, tres aislamientos de *C. kefyri*, un aislamiento de *C. sorboxilosa* y un aislamiento de *Pichia kluyveri*; y respecto a las bacterias, solo se identificó una especie de BAL (Tarifa et al., 2013). Dado que esta comunidad de microorganismos habita y persiste en las plantas productoras de jugos de frutas, se considera tanto a *Candida* spp. como *Rhodotorula* spp. como microbiota residente. Esta comunidad está ineludiblemente en contacto e intercambio con otras especies microbianas presentes en el ambiente de procesado (Tarifa et al., 2015, 2017). Se debe tener en cuenta que las bacterias que se encuentran en la superficie externa de la fruta pueden ser transferidas a las piezas recién cortadas durante la preparación y el almacenamiento, convirtiéndose la fruta procesada en un vehículo potencial para la transmisión de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. o *E. coli* O157:H7 (Ukuku et al., 2016). Se ha propuesto que, las bacterias patógenas alimentarias encontrarían sitios de anclajes en las levaduras que forman parte de la comunidad residente, y esto contribuiría a la supervivencia, la colonización y la formación de biofilms de los microorganismos patógenos, que suelen considerarse como pobres formadores de biofilms (Giaouris et al., 2014; Moons et al., 2009).

Tanto *L. monocytogenes*, *S. enterica* como *E. coli* son capaces de adherirse a diferentes superficies en contacto con los alimentos, como poliestireno, polímeros, plástico, vidrio, teflón, caucho y acero inoxidable (AI), (Blackman & Frank, 1996; Cotter et al., 2000; Møretro & Langsrud, 2004; Norwood et al., 2000; Renier et al., 2011). A fin de adherirse, los microorganismos exhiben una variedad de fenotipos que les permiten anclarse y formar biofilms. La adhesión bacteriana a las superficies está influenciada por las propiedades fisicoquímicas del medio (temperatura, pH), de la superficie (hidrofobicidad, rugosidad) y del

propio microorganismo (hidrofobicidad, flagelos o fimbrias y motilidad) (Chavant et al., 2002; Herald & Zottola, 1988; Kochkodan & Hilal, 2015; Moltz & Martin, 2005). Según lo que respecta a las características intrínsecas del microorganismo, se ha señalado que la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana está influida por la presencia de fimbrias, flagelos y polisacáridos (EPS, lipopolisacáridos y celulosa) (Bremer et al., 2015; Sutherland, 2001). Con relación a los apéndices, se pueden nombrar las fimbrias las cuales poseen residuos de aminoácidos hidrofóbicos (Rosenberg & Kjelleberg, 1986) y están involucradas en la adhesión, la motilidad, la transferencia de ADN, la formación de biofilms, y también participan facilitando las interacciones célula-célula a través de la agregación o la formación de micro colonias (Sangermani et al., 2019). En la expresión de adhesinas superficiales, podrían estar involucrados los factores de motilidad, los cuales favorecen que las células planctónicas individuales se adhieran al sustrato (O'Toole & Kolter, 1998b). En determinadas condiciones, las bacterias se vuelven altamente móviles y emigran a través del sustrato utilizando diversos mecanismos. Diferentes procesos de motilidad han sido reportados (**Figura 12**): *swarming* (movimiento superficial multicelular impulsado por flagelos helicoidales giratorios); *swimming* (movimiento individual en medio líquido alimentado por flagelos giratorios); *twitching* (movimiento sobre la superficie impulsado por la extensión y retracción de los pili), *gliding* y *sliding* (desplazamiento sin presencia de apéndices) (Kearns, 2010; Mattick, 2002; Tchoufag et al., 2019).



**Figura 12** Movimientos celulares de los microorganismos.

El fenómeno de la agregación también se conoce como una de las propiedades de la superficie de los microorganismos que participa en la adhesión (Bibiloni et al., 2001; Canzi et al., 2005). Los microorganismos que forman parte de los biofilms se asocian mediante la coagregación,

la cual es muy específica y suele realizarse mediante la unión de una proteína adhesina de un microorganismo, con un sacárido receptor de otro microorganismo (Rickard et al., 2003).

Atendiendo a la problemática que suponen los biofilms en la industria alimentaria, en este capítulo se evaluaron las principales características fisicoquímicas de superficie celular (hidrofobicidad, agregación, producción de EPS y curli a diferentes temperaturas) que están involucradas en la adhesión de *L. innocua* y *L. monocytogenes*. Además, se evaluó la supervivencia, la capacidad adherirse y formar biofilms sobre AI empleando jugo de manzana como matriz alimentaria. En una segunda instancia, debido a los escasos reportes sobre la adhesión entre posibles bacterias patógenas de alimentos y levaduras en jugo de manzana, se caracterizó la adhesión y formación de biofilms de *L. monocytogenes* y *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefir* sobre AI y MUF, incorporando como objetos de estudio *S. enterica* y *E. coli* O157:H7.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como no es posible reproducir perfectamente las condiciones reales en estudios experimentales, se establecieron cuatro factores para imitar lo más cercanamente posible la situación de la planta productora de jugo de manzana y pera: (1) Especies de levaduras aisladas de una planta de procesamiento de jugo de manzana: *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefyri*; (2) Jugo de manzana obtenido industrialmente como matriz alimentaria para la formación de biofilms; (3) Incubación a 25 °C, la cual es habitual en las plantas de procesamiento; y (4) Acero inoxidable (AI) AISI 304 y membranas de ultrafiltración de PVDF (MUF) utilizados como material en contacto con alimentos.

Las bacterias seleccionadas en este capítulo fueron en una primera instancia *L. innocua*, *L. monocytogenes* y la superficie de adhesión fue AI. En segunda instancia y teniendo en cuentas los resultados obtenidos para ambas *Listeria*, se decidió continuar trabajando con *L. monocytogenes*, y se incorporaron *S. enterica* y *E. coli* O157:H7.

La preparación de las suspensiones de los microorganismos se detalla en la sección de Materiales y Métodos generales (sección 9).

### I.1. Caracterización fisicoquímica de *Listeria*

#### I.1.1 Ensayo de hidrofobicidad

La prueba de adhesión microbiana a hidrocarburos es un ensayo bifásico agua-hexadecano en el cual las células hidrofóbicas quedan retenidas en hexadecano, lo cual produce una reducción de la DO en el cultivo inicial. Esta prueba se realizó siguiendo el procedimiento de Mattos-Guaraldi et al. (1999), y se basa en la comparación de la afinidad a solventes no polares; en este caso, hexadecano (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ). Debido a las propiedades de tensión superficial de este compuesto, se pueden revelar las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas de los microorganismos en estudio.

Se mezclaron 4 ml de la suspensión de *Listeria* ajustada en solución salina 0,023 M pH 4,3, para simular las condiciones de pH y osmolaridad del jugo de manzana, y luego se añadió 1 ml de N-hexadecano. La mezcla se sometió durante 2 minutos a agitación vigorosa con un agitador vórtex (Genie 2TM, Scientific Industries, Inc., N.Y., EE. UU.) y se dejó reposar hasta la separación completa de las fases (aprox. 10 min) incubándose a 12°, 25° y 37 °C. Posteriormente, se tomó 1 ml de la fase acuosa (cuidadosamente de manera de no perturbar las fases) y se midió la DO<sub>600</sub>. El principio de este método se basa en la medición de la caída en la

absorbancia de la fase acuosa con respecto a su valor inicial, representando así el número de células adheridas al hexadecano. La disminución en la DO de la fase acuosa se tomó como una medida de hidrofobicidad de la superficie celular (H%), y el porcentaje de células unidas a la fase orgánica se calculó con la siguiente fórmula:

$$H\% = (1 - A/A_0) \times 100$$

en la cual  $A_0$  es la de DO a 600 nm de la suspensión de la célula previo al mezclado y A es la DO a 600 nm posterior al mezclado con hexadecano. Según este método, los microorganismos se clasifican en: altamente hidrofóbicas, para valores  $>50\%$ ; moderadamente hidrofóbicas, para valores que oscilan entre el  $20\%$  y el  $50\%$ , e hidrofílicas, para valores  $<20\%$  (di Bonaventura et al., 2008)

### 1.1.2 Producción de curli y celulosa

El rojo Congo es una sal de sodio de 3,3'-([1,1'-bifenil]-4,4'-diyl) bis (4-aminonaftalen-1-ácido sulfónico), y su PM es 696.66 g/mol. Dicho colorante es soluble en agua, conformando una suspensión coloidal de color rojo. Su solubilidad es mayor en solventes orgánicos como el etanol. Por su gran afinidad por las fibras de celulosa y fimbrias agregativas, se adiciona al medio de cultivo para luego detectar dichas estructuras en las macro colonias, las cuales se asocian a la producción de biofilm (Römling & Rohde, 1999).

Se tomaron 20  $\mu$ l de cada especie de *Listeria* a partir del cultivo celular en TSB y se realizaron estrías en cajas de Petri con agar Luria Bertani (LB) (1 g Triptona, 0,5 g, Extracto de levadura, 1,5 g Agar, 100 ml agua destilada, pH: 7), sin NaCl suplementado con 40 mg/l de Rojo Congo (Sigma, Saint Louis, MO). Las placas se incubaron 72 h a  $12^\circ$ ,  $25^\circ$  y  $37^\circ$  C. Se realizó un registro fotográfico de la morfología de las colonias de *Listeria* y se clasificaron según Römling et al., (2000):

BDAR: fenotipo marrón, seco y rugoso. Expresa solo curli

RDAR: fenotipo rojo, seco y rugoso. Expresa curli y celulosa.

PDAR: fenotipo rosa y lisa. Expresa celulosa.

SAW: fenotipo blanco y suave. No expresa curli ni celulosa.

La determinación del morfotipo RDAR debe complementarse con el estudio de unión de la celulosa a calcoflúor. El calcoflúor es un fluoruro que se une a las fibras de celulosa y, en consecuencia, puede usarse para determinar la presencia de este polisacárido en la matriz de los biofilms. Para esto, al agar LB, sin NaCl, se le añadió Calcoflúor (20 mg Calcoflúor/ 100 ml), siguiendo la técnica descrita por Zogaj et al. (2001). Luego las placas se incubaron 72 h a

12°, 25° y 37 °C y se observaron bajo luz UV a una longitud de onda de 365 nm. Al finalizar, se realizó un registro fotográfico de la morfología de *Listeria*.

### *1.1.3 Ensayos de motilidad*

Los ensayos de swimming, swarming y twitching se realizaron según lo descrito por Rashid & Kornberg (2000), con algunas modificaciones. Se tomaron colonias individuales de *Listeria* crecidas overnight en agar PCA y se transfirieron, utilizando una aguja estéril, a la superficie del agar de swimming (10 g/l de triptona, 5 g/l de ClNa y 0,3 % de agar) y agar swarming (8 g/l caldo nutritivo, 5 g/l glucosa y 0,5 % agar), luego se incubaron 48 h a 12°, 25° y 37 °C. Las placas de swarming se dejaron secar a temperatura ambiente antes de ser utilizadas para obtener una mejor visualización. Los resultados se expresaron como diámetro (mm) del halo de crecimiento formado alrededor del punto de inoculación. El agar twitching (10 g/l triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l ClNa y 1 % de agar) se inoculó mediante el uso de una aguja estéril, en el fondo de la placa de Petri. Después de 48 h se midió el diámetro (mm) de migración y crecimiento.

Para corroborar la movilidad de *Listeria*, se inoculó un cultivo puro en un tubo con medio semisólido (triptosa 10 g/l, ClNa 5 g/l, Agar 5 g/l y agua destilada 1000 ml) haciendo una punción con ansa recta. Se dejó incubar una noche a 25 °C (Mac Faddin, 1990).

### *1.1.4 Ensayos de agregación*

La agregación (auto y coagregación) se evaluó con el fin de tener una perspectiva de la posible incidencia del proceso de sedimentación de las bacterias y de las levaduras, como se describe en Collado et al. (2008). Las suspensiones ajustadas de levaduras y bacterias fueron colocadas en cubetas de 3,500 µl utilizadas para espectrofotometría y se incubaron a temperatura ambiente (21 °C) sin agitación. Para los ensayos de agregación entre levaduras + *Listeria* se mezclaron volúmenes iguales (1,5 ml) de cada suspensión ajustada, en una proporción 1:1. En la siguiente **Tabla 3** se detallan las combinaciones empleadas.

**Tabla 3** Combinaciones de agregación evaluadas.

<b>Autoagregación</b>		
<i>L. monocytogenes</i>		
<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
<i>C. tropicalis</i>	•	•
<i>C. krusei</i>	•	•
<i>C. kefyr</i>	•	•
<i>R. mucilaginosa</i>	•	•

La absorbancia se midió durante 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 min en un espectrofotómetro de luz visible (DO<sub>600</sub> nm); se tomaron 200 µl de muestra de la superficie, con la precaución de no perturbar la suspensión.

El % de autoagregación se calculó a través de la fórmula:

$$A\% = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

donde A<sub>0</sub> representa la DO<sub>600</sub> en el min 0 y A<sub>t</sub> representa la DO<sub>600</sub> a 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 min.

El % de agregación se calculó de acuerdo con la fórmula de Malik et al. (2003) con modificaciones:

$$(A_{\text{bacteria}} + A_{\text{levadura}}) - (A_{\text{mezcla}}) / (A_{\text{bacteria}} + A_{\text{levadura}}) \times 100$$

donde A<sub>bacteria</sub>+A<sub>lev</sub> representan las absorbancias de la mezcla bacteria/levadura en el tiempo 0 min, y A<sub>mezcla</sub> refleja la absorbancia de las suspensiones en cada uno de los tiempos analizados.

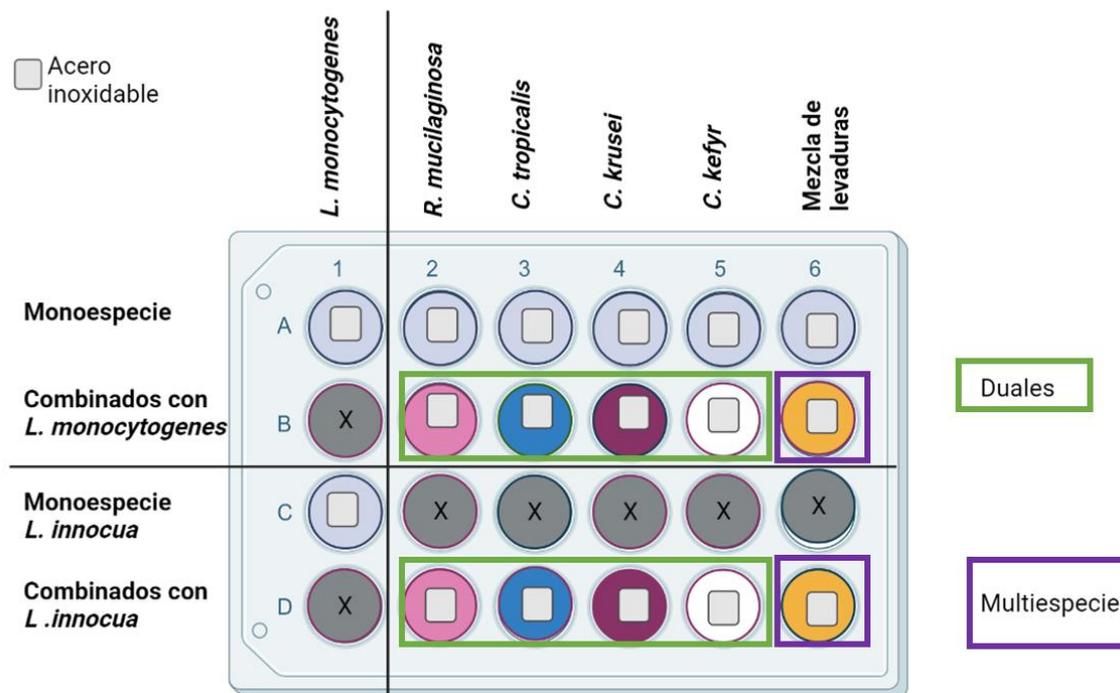
### 1.1.5 Supervivencia de *Listeria* en jugo de manzana

Factores tales como el pH, la temperatura y la composición de nutrientes, tienen un papel significativo en la transformación fenotípica de las células planctónicas a la forma sésil. Para adherirse a las superficies industriales y posteriormente formar biofilms, es necesario asegurar que las especies sobrevivan en la matriz alimentaria en estudio, en este caso, jugo de manzana. Las levaduras fueron aisladas de estos sistemas de producción, lo cual se considera un indicador de su supervivencia, por lo tanto, nos centraremos en *Listeria*. Las suspensiones ajustadas de *Listeria* se incubaron a 25 °C durante 2, 4, 8, 24 y 48 h. A su vez, se realizaron cultivos en caldo TSB a un pH equivalente al jugo de manzana como control, ajustado con la adición de

HCl 0,1 M. Posteriormente, se realizaron los recuentos mediante diluciones seriadas y se utilizó agar PCA y OXF; luego, los resultados se expresaron como log UFC/ml±DE.

### I.2 Biofilms sobre acero inoxidable

En esta experiencia, se estudiaron las adhesiones de cultivos monoespecie, duales y multiespecie de la/s levadura/s y/o *Listeria*. En la **Figura 13** se esquematizan las combinaciones evaluadas para el estudio de adhesión.



**Figura 13** Esquema de las combinaciones evaluadas entre *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* y las levaduras sobre acero inoxidable.

En el caso de los biofilms duales y multiespecie, las levaduras se pusieron en contacto por 4 h con la superficie de AI, a 25 °C, a fin de obtener un biofilm preformado de levaduras. Pasado este tiempo, se retiró la suspensión, se hizo un lavado para eliminar las células no adheridas y se le adicionó la suspensión de *L. innocua* o *L. monocytogenes* incubándose por 20 h (completando así las 24 h).

Las muestras fueron analizadas mediante recuento celular (sección 11) y se prepararon para la observación por SEM y microscopía de fluorescencia (sección 12).

### I.3 Biofilms sobre membranas de ultrafiltración (MUF)

Luego de caracterizar lo que ocurre entre las especies de *Listeria* y las levaduras sobre AI, se procedió a evaluar la adhesión y formación de biofilms en otra superficie de relevancia de uso alimentario, la MUF, utilizando jugo de manzana como matriz alimentaria.

#### I.3.1 Adhesión y formación de los biofilms monoespecie de *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefir* y de la mezcla de levaduras.

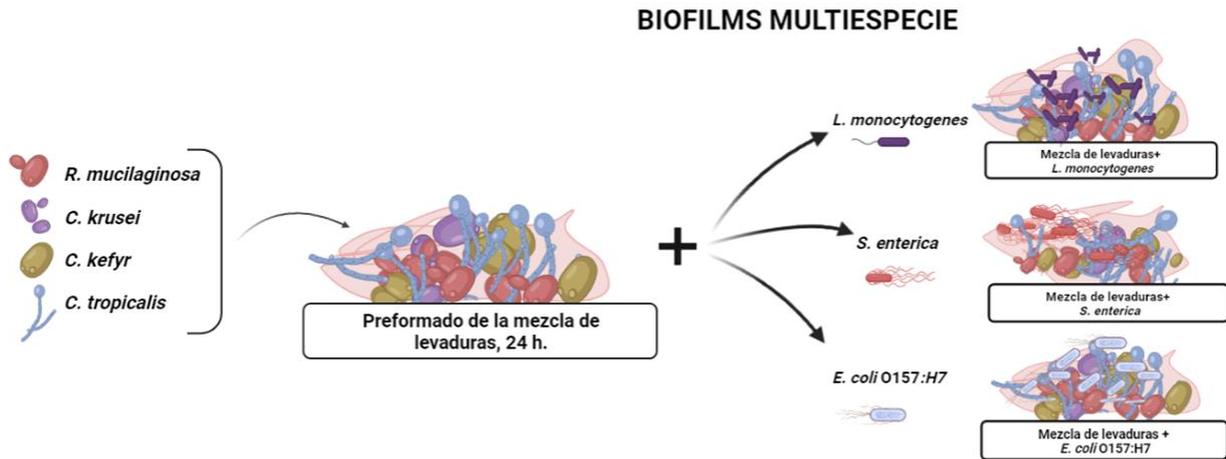
Se caracterizó la adhesión monoespecie y la mezcla de las levaduras sobre MUF, con el fin de profundizar los conocimientos respecto a su comportamiento y distribución. Para la formación de biofilms se añadieron 2 ml de la suspensión ajustada de levaduras sobre MUF. Tras 2 h de incubación a 25° C se tomó la primera muestra para analizar. Luego de 4 h se enjuagaron las superficies con agua destilada estéril para remover las células no adheridas y se les añadió jugo de manzana estéril, durante 6, 24, 48, 72 h y 168 h.

#### I.3.2 Formación de biofilms multiespecie: mezcla de levaduras en presencia de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* 0157:H7.

Para la formación de los biofilms multiespecie, la mezcla de levaduras se puso en contacto durante 4 h con la MUF, luego se realizaron los respectivos lavados y se renovó el medio con jugo de manzana hasta completar 24 h (preformado de levaduras). Pasado este tiempo se enjuagó la superficie con agua estéril y se le añadió la suspensión bacteriana correspondiente por 24 y 48 h más (correspondiente a 48 y 72 h de adhesión de las levaduras) a 25 °C.

Un caso interesante es estudiar el potencial escenario de la contaminación de instalaciones industriales con especies pre adaptadas a la condición de acidez impuesta por el jugo de manzana, como podría suceder, por ejemplo, durante el procesamiento. En consecuencia, para evaluar la formación de biofilms multiespecie, las suspensiones celulares de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* 0157:H7 se pre adaptaron durante 4 h en jugo de manzana (sección 9.2). Luego se ajustó la suspensión ( $10^8$  UFC/ml) en jugo de manzana y se añadió al biofilm preformado de levaduras por 24 y 48 h más. A su vez, como control, se evaluó la adhesión monoespecie de cada bacteria patógena en MUF.

Las combinaciones de los microorganismos ensayados fueron las siguientes: a) mezcla de levaduras+ *L. monocytogenes*, b) mezcla de levaduras+ *S. enterica*, c) mezcla de levaduras+ *E. coli* O157:H7 (**Figura 14**).



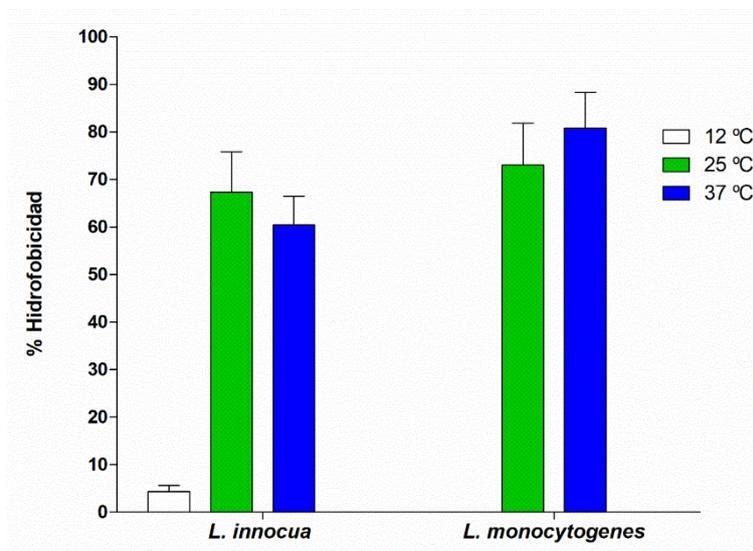
**Figura 14** Representación esquemática de la formación de biofilms multiespecie en membranas de ultrafiltración.

## RESULTADOS

### I.4 Caracterización fisicoquímica de *Listeria*

#### I.4.1 Ensayo de hidrofobicidad

En la **Figura 15** se presentan los porcentajes de hidrofobicidad (H%) de *Listeria* obtenidos a partir del ensayo de afinidad al hexadecano. No se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre 25 °C y 37 °C, tanto para *L. innocua* como para *L. monocytogenes*, pero si cuando se compararon estas temperaturas con 12 °C ( $p < 0,001$ ) en ambas especies. Al comparar el %H entre ambas especies a la misma temperatura, *L. monocytogenes* presentó un mayor porcentaje de hidrofobicidad a los 37 °C ( $p < 0,05$ ). Siguiendo los criterios de Di Bonaventura et al. (2008), ambas *Listeria* resultaron altamente hidrofóbicas a los 25 °C y 37 °C ( $\%H > 50$ ), e hidrofílicas a los 12 °C ( $\%H < 20$ ).



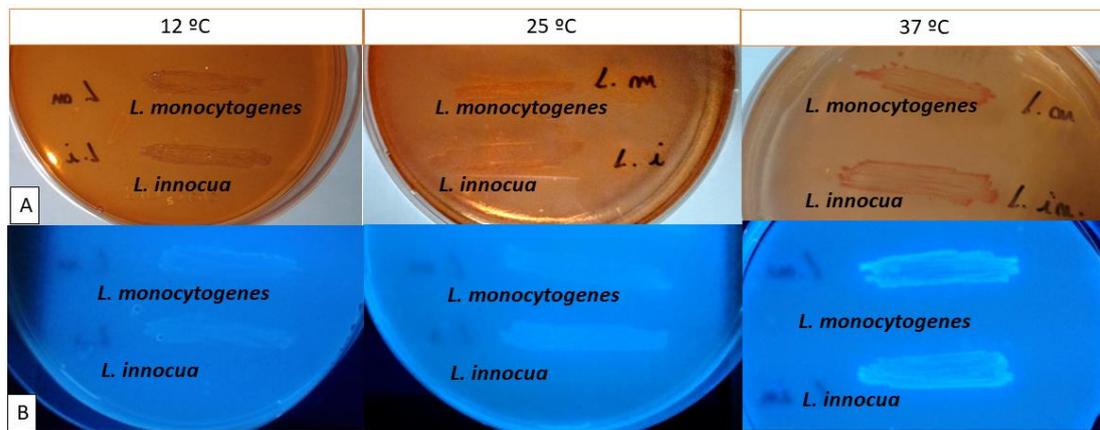
**Figura 15** Porcentaje de hidrofobicidad de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* empleando hexadecano a 12, 25 y 37 °C.

Los valores mostrados corresponden al promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  DE a diferentes temperaturas.

#### I.4.2 Expresión de celulosa y fimbria curli

La observación macroscópica de las colonias de *L. innocua* y *L. monocytogenes* (**Figura 16**) revela que ambas especies produjeron colonias rojas/rosas, secas, rugosas a los 37 °C. Esto correspondería al fenotipo denominado RDAR, lo cual se confirma la producción de curli y

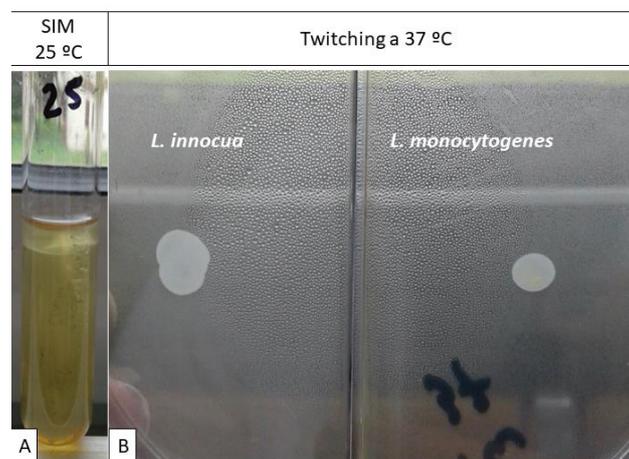
celulosa en el agar LB con Rojo Congo. Este fenotipo fue confirmado por la presencia de fluorescencia en el medio LB con calcoflúor. A los 12 y 25 °C la tonalidad de las colonias es rosada y de tipo rugosa, y si bien la fluorescencia fue más tenue que a los 37 °C esta se consideró positiva.



**Figura 16** Expresión de curli y celulosa de *L. monocytogenes* y *L. innocua* a 12°, 25° y 37 °C. A): LB suplementado con Rojo Congo; B): LB suplementado con calcoflúor.

#### 1.4.3 Motilidad

Con respecto a la motilidad, los hallazgos mostraron que ni *L. innocua* ni *L. monocytogenes* presentan swarming, pero sí twitching a 25 y 37 °C. En cuanto al swimming, ambas bacterias migraron una distancia media de  $7,0 \pm 1,0$  mm a 12, 25 y 37 °C. Posteriormente, se confirmó la motilidad a 25 °C en un medio semisólido (SIM), observándose crecimiento en la parte superior, con forma similar a un paraguas (característico de *Listeria*). En la **Figura 17** se muestran algunas imágenes.



**Figura 17** Evaluación de la movilidad de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* mediante SIM a 25 °C y twitching a 37 °C.

#### 1.4.4 Autoagregación y coagregación

Para evaluar si los coeficientes de agregación se debían principalmente a la autoagregación y sedimentación de las células de levadura, se calculó primero el porcentaje de autoagregación de cada especie involucrada y se comparó con los valores de agregación. Como se muestra en la **Tabla 4** los valores de autoagregación de *L. monocytogenes* y *L. innocua* no superan el 5 %; mientras que, las levaduras presentaron porcentajes de agregación mayores que las bacterias: 59 % para *C. tropicalis* y *C. krusei*, 40 % para *C. kefir*, y 20 % para *R. mucilaginosa* a los 120 min.

En los ensayos de agregación entre levaduras y *Listeria* se exhibieron valores superiores al 50 % en los primeros 5 min (**Tabla 5**), siendo el porcentaje de coagregación significativamente mayor que el de autoagregación (**Tabla 4**) para todos los casos estudiados. Al comparar la agregación *L. innocua*-levadura y *L. monocytogenes*-levadura no se hallaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ), es decir, ambas especies de *Listeria* presentan similares valores de agregación con las levaduras.

**Tabla 4** Porcentaje de autoagregación de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Candida krusei*, *Candida kefir*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa*.

T (min)	Autoagregación					
	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefir</i>
5	1,61±0,40 ns	0,00±0,00	5,30 ± 0,15	27,20 ± 1,15	28,30±0,50	15,5±0,22
10	1,61±0,21 ns	0,00±0,00 ns	5,30 ± 0,20 ns	29,20 ± 2,00 ns	28,30±0,22 ns	15,9±0,22 ns
15	1,61±0,02 ns	0,00±0,00 ns	9,20 ± 0,80 ***	31,07 ± 2,00 ns	34,40±0,18 ***	17,8±0,18 ***
30	1,61±0,50 ns	0,00±0,00 ns	11,20 ±0,62 ***	46,20 ± 1,80 ***	35,20±0,62 ***	18,2±0,21 ***
60	2,69±0,11 *	1,12±0,10 *	14,70 ± 0,68 ***	80 ± 1,62 ***	43,30±0,28 ***	28,7±0,28 ***
90	4,84±0,42 ***	1,12±0,40 *	17,80 ± 0,30 ***	76,7 ± 3,30 ***	53,40±0,33 ***	36,7±0,17 ***
120	4,84±0,60 ***	1,12±0,31 *	25,65 ± 0,04 ***	79,2 ± 3.30 ***	59,50±0,26 ***	40,7±0,15 ***

(T) Tiempo. Las diferencias significativas se expresan en referencia al tiempo 5 min de cada fila.

**Tabla 5** Porcentajes de coagregación de las levaduras en presencia de *Listeria monocytogenes*.

Tiempo (min)	Coagregación con <i>L. monocytogenes</i>			
	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefir</i>
5	55,0 ± 2,90 <sup>***</sup>	56,2 ± 1,15 <sup>***</sup>	61,0±1,05 <sup>***</sup>	55,0±2,90 <sup>***</sup>
10	58,3 ± 4,5 <sup>***</sup>	57,8 ± 1,02 <sup>***</sup>	61,2±1,00 <sup>***</sup>	56,1±3,50 <sup>***</sup>
15	58,3 ± 3,7 <sup>***</sup>	58,5 ± 1,02 <sup>***</sup>	61,9±1,02 <sup>***</sup>	56,6±4,15 <sup>***</sup>
30	58,3 ± 4,5 <sup>***</sup>	60,3 ± 1,02 <sup>***</sup>	63,7±1,01 <sup>***</sup>	57,7±3,20 <sup>***</sup>
60	58,9 ± 5,1 <sup>***</sup>	64,6 ± 1,13 <sup>***</sup>	66,9±1,13 <sup>***</sup>	60,4±5,01 <sup>***</sup>
90	59,5 ± 4,7 <sup>***</sup>	65,9 ± 1,47 <sup>***</sup>	70,3±1,27 <sup>***</sup>	62,1±4,00 <sup>***</sup>
120	60,5 ± 3,3 <sup>***</sup>	68,7 ± 1,90 <sup>***</sup>	71,7±1,30 <sup>***</sup>	64,1±3,31 <sup>***</sup>

Las diferencias significativas se expresan en referencia a los valores de autoagregación de las levaduras expresados en la Tabla 4.

**Tabla 6** Porcentaje de coagregación de las levaduras en presencia de *Listeria innocua*.

Tiempo (min)	Coagregación con <i>L. innocua</i>			
	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefir</i>
5	53,0 ± 0,2 <sup>***</sup>	57,5 ± 0,97 <sup>***</sup>	60,5±0,96 <sup>***</sup>	55,2±0,33 <sup>***</sup>
10	53,3 ± 0,4 <sup>***</sup>	58,8 ± 0,86 <sup>***</sup>	60,7±0,86 <sup>***</sup>	55,6±0,21 <sup>***</sup>
15	53,9 ± 0,2 <sup>***</sup>	58,5 ± 0,86 <sup>***</sup>	61,4±1,15 <sup>***</sup>	56,1±0,02 <sup>***</sup>
30	55,6 ± 0,0 <sup>***</sup>	62,6 ± 1,05 <sup>***</sup>	63,2±0,84 <sup>***</sup>	57,2±0,50 <sup>***</sup>
60	55,6 ± 0,1 <sup>***</sup>	65,7 ± 0,64 <sup>***</sup>	66,5±0,83 <sup>***</sup>	60,0±0,11 <sup>***</sup>
90	56,8 ± 0,4 <sup>***</sup>	67,0 ± 0,83 <sup>***</sup>	70,0±0,70 <sup>***</sup>	61,7±0,42 <sup>***</sup>
120	59,2 ± 0,6 <sup>***</sup>	69,3 ± 0,60 <sup>***</sup>	71,4±1,00 <sup>***</sup>	63,7±0,60 <sup>***</sup>

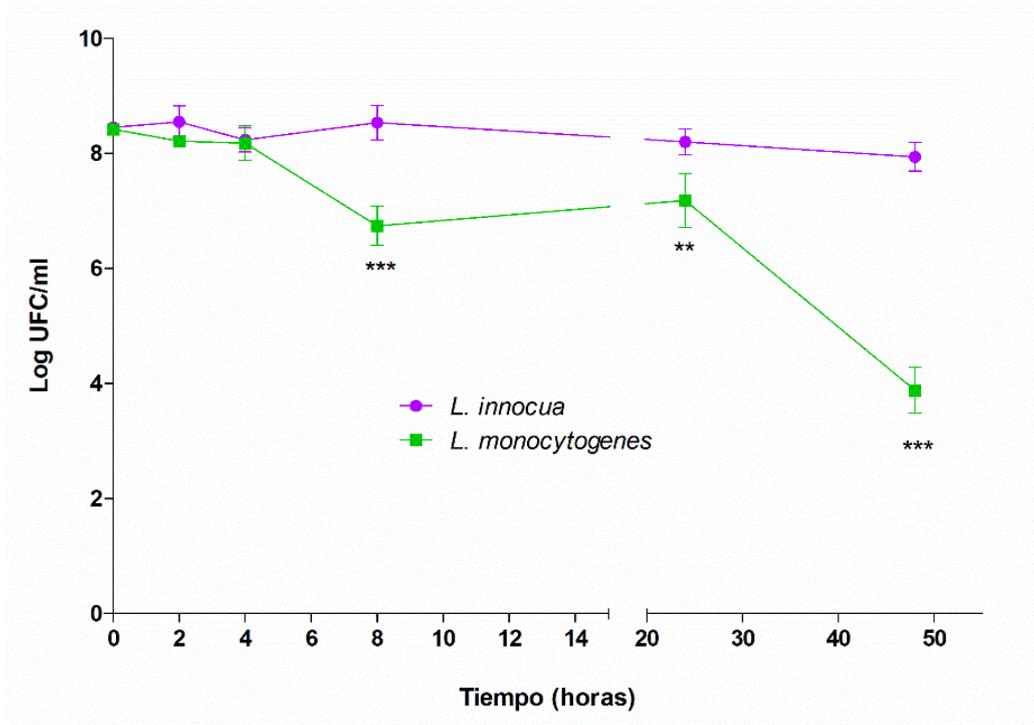
Las diferencias significativas se expresan en referencia a los valores de autoagregación de las levaduras expresados en Tabla 4.

#### 1.4.5 Supervivencia de *Listeria* en jugo de manzana

Como se muestra en la **Figura 18**, la población de células viables de *L. monocytogenes* sufrió una reducción respecto al inóculo inicial ( $T_0$ ) de 1,22 y 3,52 log UFC/ml a las 24 y 48 h, respectivamente. *L. innocua* no mostró diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los tiempos evaluados, a diferencia de *L. monocytogenes*, quien comienza a reducir su población a las 8 h

( $p < 0,001$ ). Si bien disminuye su número, *L. monocytogenes* logró sobrevivir y mantenerse en un número mayor o igual a 4 log UFC/ml en las condiciones impuestas.

Para observar si existían diferencias en la recuperación de las células cultivables, los recuentos de *L. monocytogenes* y *L. innocua* se realizaron en dos medios de cultivos diferentes (agar PCA y OXF). Como resultado se encontró que el empleo de un medio u otro no afectaba la recuperación ( $p > 0,05$ ).



**Figura 18** Supervivencia de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* en jugo de manzana después de 2, 4, 8, 24 y 48 h a 25 °C.

Los datos se expresan como log UFC/ml  $\pm$  DE. Las diferencias significativas se expresan en referencia al tiempo 0.

## I.5 Adhesión y formación de biofilms sobre acero inoxidable

### I.5.1 *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*

Una vez efectuada la caracterización fisicoquímica de las cepas de *Listeria*, se evaluó la adhesión a diferentes tiempos sobre AI. Los resultados de las adhesiones monoespecie se presentan en la **Tabla 7**. *L. innocua* se mantuvo en un rango de 6,15–6,75 log UFC/cm<sup>2</sup> y no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos evaluados ( $p > 0,05$ ), mientras que *L. monocytogenes* incrementa su recuento celular significativamente ( $p < 0,01$ ) a las 8 h

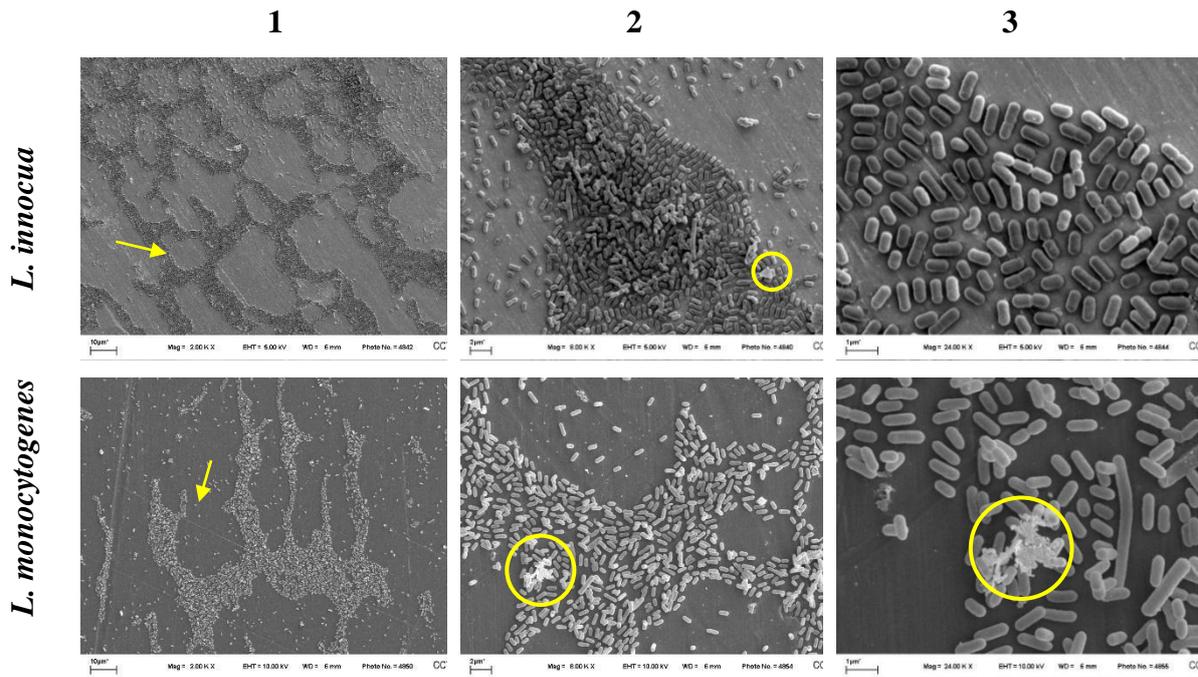
alcanzando su máxima adhesión, luego disminuye significativamente ( $p < 0,01$ ) a las 48 h. Al comparar las adhesiones entre las especies, se observó que *L. innocua* se adhiere más al AI que *L. monocytogenes*, encontrándose diferencias significativas a las 3 h ( $p < 0,01$ ), 24 h ( $p < 0,05$ ) y 48 h ( $p < 0,01$ ).

Las imágenes de microscopía (**Figura 19** y **Figura 20**) revelan la disposición de *L. monocytogenes* y *L. innocua* después de 24 h de contacto sobre AI. Las células de *Listeria* presentan una distribución uniforme por toda la superficie alimentaria, consistiendo en capas de células cohesivas consolidadas en una red tridimensional con huecos intersticiales incluidos, formando pequeños grupos o micro colonias. En determinadas áreas se observan grandes acúmulos celulares, lo que pareciera un biofilm más desarrollado, mientras que en otras zonas de la superficie la estructura aún se está desarrollando (solamente una monocapa de células adheridas). Respecto a la distribución de las células, podría señalarse la disposición en la superficie en acúmulos semejantes a panales de abeja, con células apiladas alrededor del perímetro de los espacios vacíos, siendo esta distribución más evidente en *L. innocua* que en *L. monocytogenes*. Ambas *Listeria* producen ciertos residuos en forma hilada y conglomerada, los cuales formarían parte de la matriz de EPS; esto pareciera que facilitaría el enganche y anclaje a otras estructuras celulares (**Figura 19**, columnas 2 y 3, círculos amarillos). Con relación a la viabilidad, en la **Figura 20** se revela la presencia de células no dañadas (verdes) y dañadas (rojas). La mayor presencia de células dañadas se observa para *L. monocytogenes*, esto coincide con los recuentos en los cuales se obtuvo una disminución tras 24 h.

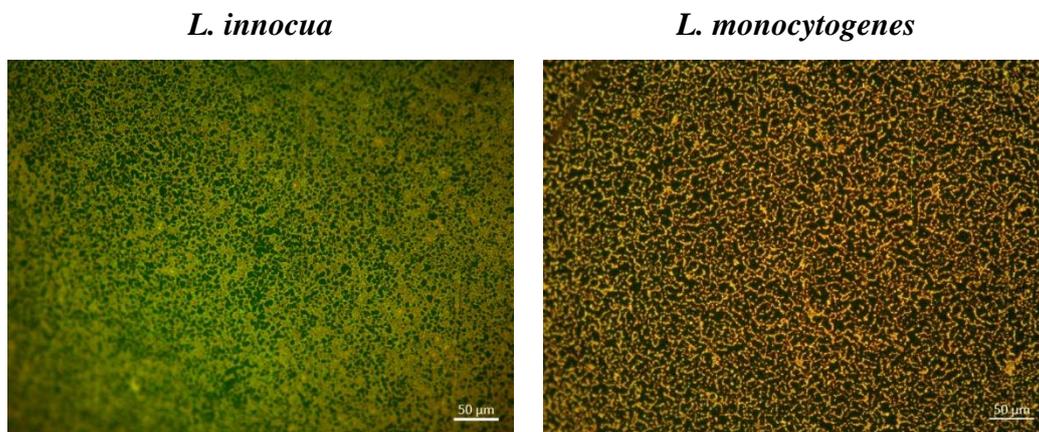
**Tabla 7** Recuento de las células viables cultivables adheridas sobre acero inoxidable de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* durante 3, 8, 24 y 48 h en jugo de manzana. Los resultados se expresan como  $\log \text{UFC/cm}^2 \pm \text{DE}$ .

Tiempo (h)	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>
3	$6,75 \pm 0,09$	$5,79 \pm 0,13$
8	$6,74 \pm 0,23^{\text{ns}}$	$6,70 \pm 0,28^{**}$
24	$6,64 \pm 0,01^{\text{ns}}$	$5,80 \pm 0,21^{\text{ns}}$
48	$6,15 \pm 0,14^{\text{ns}}$	$4,83 \pm 0,52^{**}$

Las diferencias significativas se expresan en referencia al tiempo 3 h.



**Figura 19** Imágenes obtenidas por SEM de biofilms de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* después de 24 h de adhesión sobre acero inoxidable. Se señala con flechas amarillas los huecos intersticiales y con círculos amarillos restos de EPS. Magnificaciones: 2.00 KX (1), 8.00 KX (2) y 24.00 KX (3).

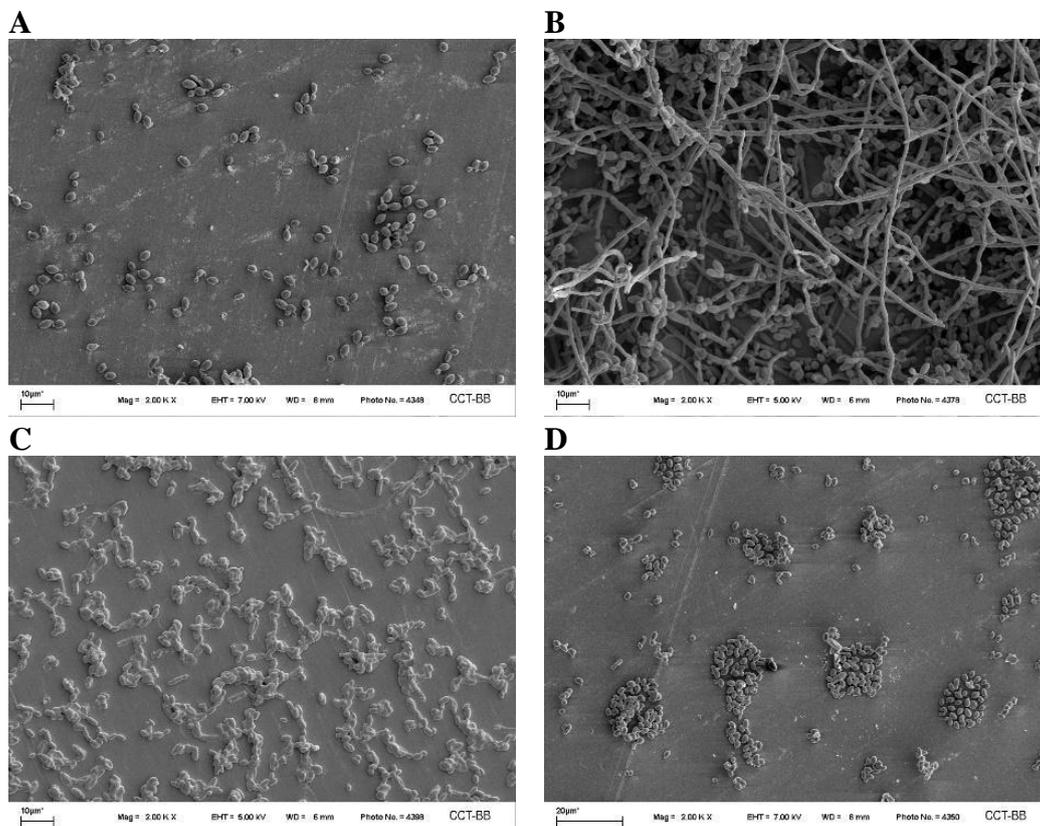


**Figura 20** Imágenes de microscopía de fluorescencia de biofilms de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* después de 24 h de adhesión sobre acero inoxidable. Aumento 10 X.

### 1.5.2 Biofilms de *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefyr*

Una vez analizado el comportamiento de *Listeria*, se procedió con el análisis de las cuatro levaduras utilizadas. Los valores de adhesión encontrados después de 24 h de contacto con AI fueron los siguientes:  $6,47 \pm 0,19$ ,  $8,35 \pm 0,08$ ,  $7,92 \pm 0,03$ ,  $8,49 \pm 0,09$  log UFC/cm<sup>2</sup> para *R.*

*mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefyr*, respectivamente. Las imágenes de SEM (**Figura 21**) muestran que todas las especies analizadas se adhieren a la superficie en estudio, difiriendo de acuerdo con la identidad de la especie. Las células de *R. mucilaginosa* (**Figura 21, A**) presentan una estructura ovoide circular alargada, característica del género, las cuales se distribuyen en grupos celulares no muy densos, cubriendo parcialmente la superficie. *C. tropicalis* coloniza toda el área, formando estructuras tridimensionales compuestas por blastoporas (forma de levadura) y pseudohifas que muestran un crecimiento profuso y continuo (**Figura 21, B**). *C. krusei* se distribuye sobre la superficie como células concatenadas y las células de *C. kefyr* se disponen formando micro colonias y agrupados celulares (**Figura 21, C y D**).

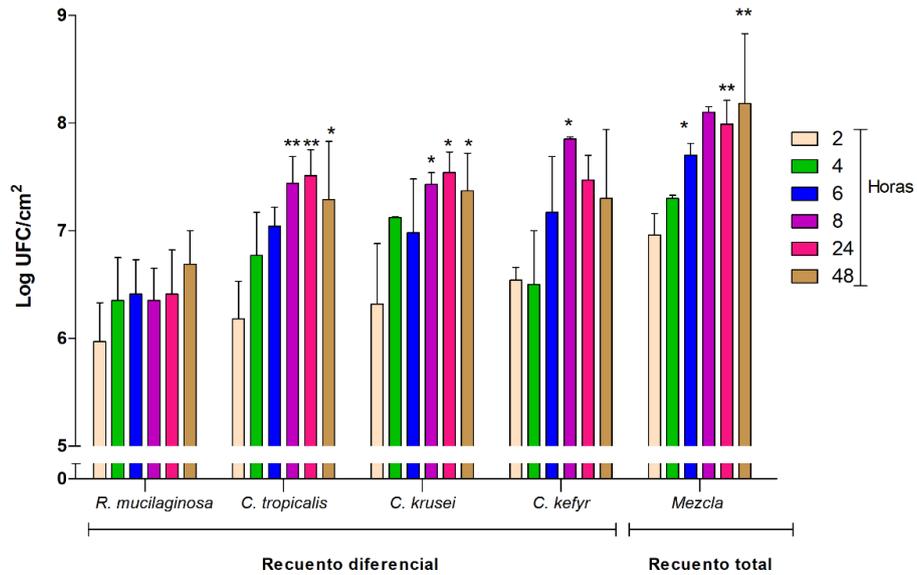


**Figura 21** Formación de biofilms mono especie de *Rhodotorula mucilaginosa* (A), *Candida tropicalis* (B), *Candida krusei* (C), *Candida kefyr* (D) después de 24 h sobre acero inoxidable en jugo de manzana a 25 °C. Magnificación 2.00 K.

Las adhesiones mono especie nos brinda información sobre el comportamiento de cada levadura en el microambiente generado en la industria procesadora de jugo de manzana; sin embargo, no alcanza para representar el escenario real. Por ello, para asemejarnos a las condiciones reales se caracterizó la adhesión y el comportamiento de la mezcla de las cuatro especies de levaduras.

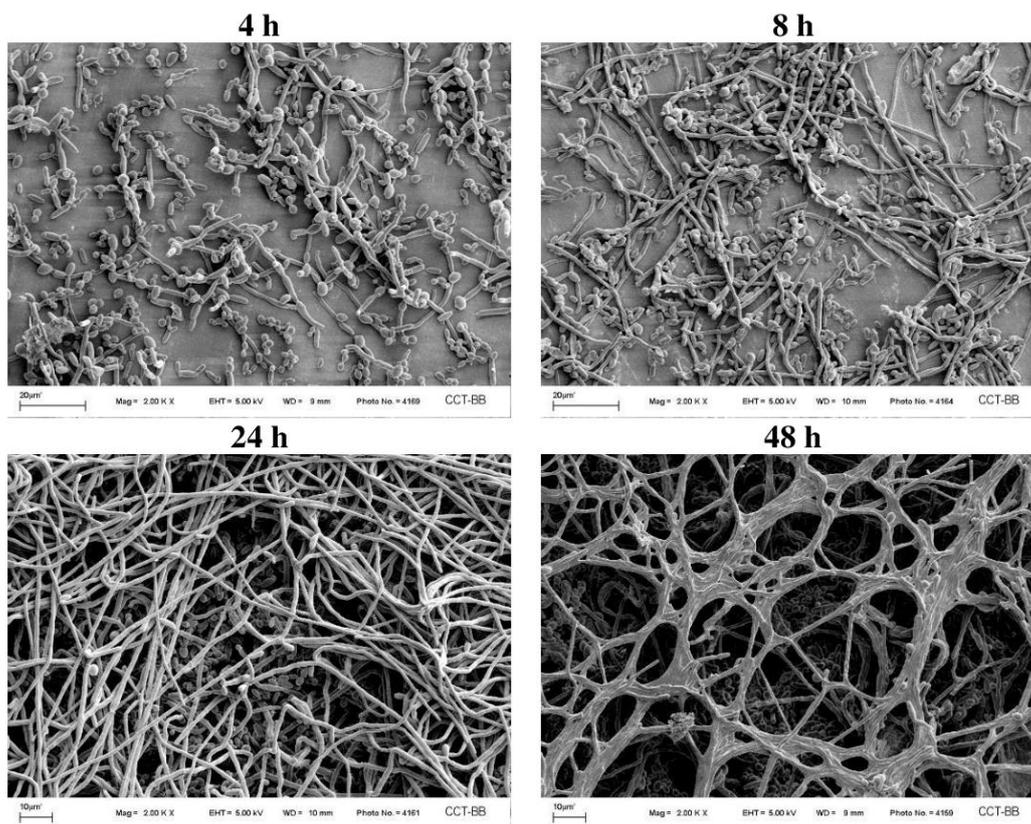
Como se muestra en la **Figura 22** el recuento de las levaduras comienza a incrementarse significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir de las 8 h y alcanza su valor máximo a las 48 h. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el recuento total de levaduras a las 8, 24 y 48 h. El recuento diferencial no mostró diferencias significativas entre las adhesiones de *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefyr*, pero si para *R. mucilaginosa* ( $p < 0,05$ ) al evaluar especie por especie dentro del biofilm formado por la mezcla de las cuatro levaduras.

El biofilm formado sobre AI se observó por SEM (**Figura 23**) y por microscopía de fluorescencia (**Figura 24**). Tras 4 h de incubación se observa la presencia de blastoporas aisladas y pseudohifas adheridas a la superficie. Tras 24 h, se observa una estructura más compleja, formada por acúmulos de blastoporas y pseudohifas de gran tamaño. Esta estructura compleja alcanza una mayor madurez estructural a las 48 h. Al mismo tiempo, los biofilms se analizaron por microscopía de fluorescencia para analizar el estado metabólico de las levaduras. La presencia de conglomerados verdes fluorescentes nos indica que las membranas celulares están intactas, dando indicios que las células se encuentran metabólicamente activas, principalmente a las 4, 8 y 24 h. Tras 48 h las células que forman la capa más externa del biofilms, cambiaron su tonalidad a naranja-rojo fluorescente. Este cambio, podría indicarnos alguna modificación en la membrana. Como se puede observar en las **Figura 23** y **Figura 24**, la mezcla de levadura es capaz de desarrollar biofilms maduros con una estructura tridimensional compacta y densa que cubre la totalidad de la superficie después de 24 h sobre AI.

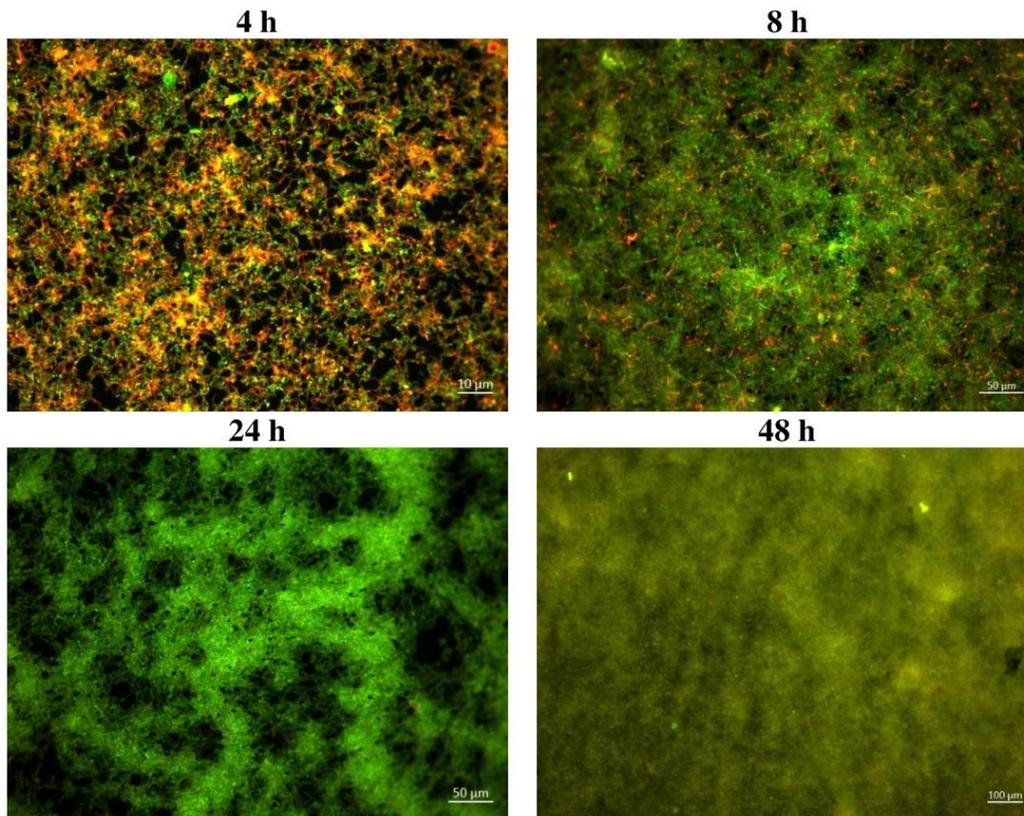


**Figura 22** Adhesión de la mezcla de *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefyr* después de 2, 4, 6, 8, 24 y 48 h de contacto en acero inoxidable.

Los resultados se expresan como log UFC/cm<sup>2</sup>±DE. Las diferencias significativas están en relación con el tiempo 2 h.



**Figura 23** Imágenes de SEM del biofilms de la mezcla de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida kefyr* sobre acero inoxidable a diferentes tiempos. Magnificación 2.00 KX.



**Figura 24** Imágenes de microscopía de fluorescencia de los biofilms de la mezcla de *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefir* sobre acero inoxidable a diferentes tiempos. Magnificación 10X.

### 1.5.3 Biofilms duales y multiespecie

Una vez establecida la supervivencia y adhesión de las bacterias y levaduras en el jugo de manzana, se procedió a analizar lo que sucedería cuando las bacterias ingresan a un sistema ya colonizado. Los recuentos de las levaduras formando biofilms duales y multiespecie en presencia de *Listeria* se describen en la **Tabla 8** y las adhesiones de *L. innocua* y *L. monocytogenes* en presencia de las levaduras en la **Tabla 9**.

En el par *L. innocua*-*R. mucilaginosa*, se redujo 0,53 log UFC/cm<sup>2</sup> *L. innocua* ( $p > 0,01$ ) y 0,85 log UFC/cm<sup>2</sup> *R. mucilaginosa* ( $p > 0,001$ ) al compararse con sus respectivos controles; similares reducciones fueron obtenidas para el par *L. innocua*-*C. kefir*. En cambio, en el biofilm dual de *L. innocua*-*C. krusei* tanto la bacteria como la levadura incrementan su adhesión ( $p > 0,01$ ) respecto al control. En el par *L. innocua*-*C. tropicalis*, únicamente la bacteria incrementó el número de células adheridas (0,96 unidades logarítmicas) en presencia de la levadura. Cuando *L. innocua* se puso en contacto con la mezcla de levaduras (biofilms multiespecie), se observó

que la presencia de la bacteria no afectó la adhesión de las levaduras, mientras que *L. innocua* disminuyó 1,23 unidades logarítmicas ( $p < 0,001$ ).

En los biofilms duales formados en presencia de *L. monocytogenes*, se vio afectada significativamente la adhesión de *C. krusei* ( $p < 0,01$ ) y de *C. kefyri* ( $p < 0,001$ ) y no se modificó la adhesión de la bacteria ( $p > 0,05$ ). En los biofilms multiespecie, tanto la mezcla de levaduras como *L. monocytogenes* mantuvieron sus valores de adhesión similares a las de sus controles ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 8** Recuento de levaduras en biofilms duales y multiespecie en presencia de *Listeria* después de 24 h de contacto en acero inoxidable. Los resultados se expresan como log UFC/cm<sup>2</sup> ± DE.

	Duales			Multiespecie	
	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefyri</i>	Mezcla de levaduras
<b>Control levaduras</b>	6,47±0,19	8,35±0,00	7,92±0,03	8,49±0,08	8,35±0,43
<i>L. innocua</i>	5,62±0,01**	8,39±0,08 <sup>ns</sup>	8,27±0,01**	7,68±0,03***	8,67±0,07 <sup>ns</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	6,40±0,21 <sup>ns</sup>	8,26±0,07 <sup>ns</sup>	7,41±0,16**	7,38±0,20***	8,90±0,11 <sup>ns</sup>

Las diferencias significativas se refieren al recuento de levadura control y en presencia de *Listeria*.

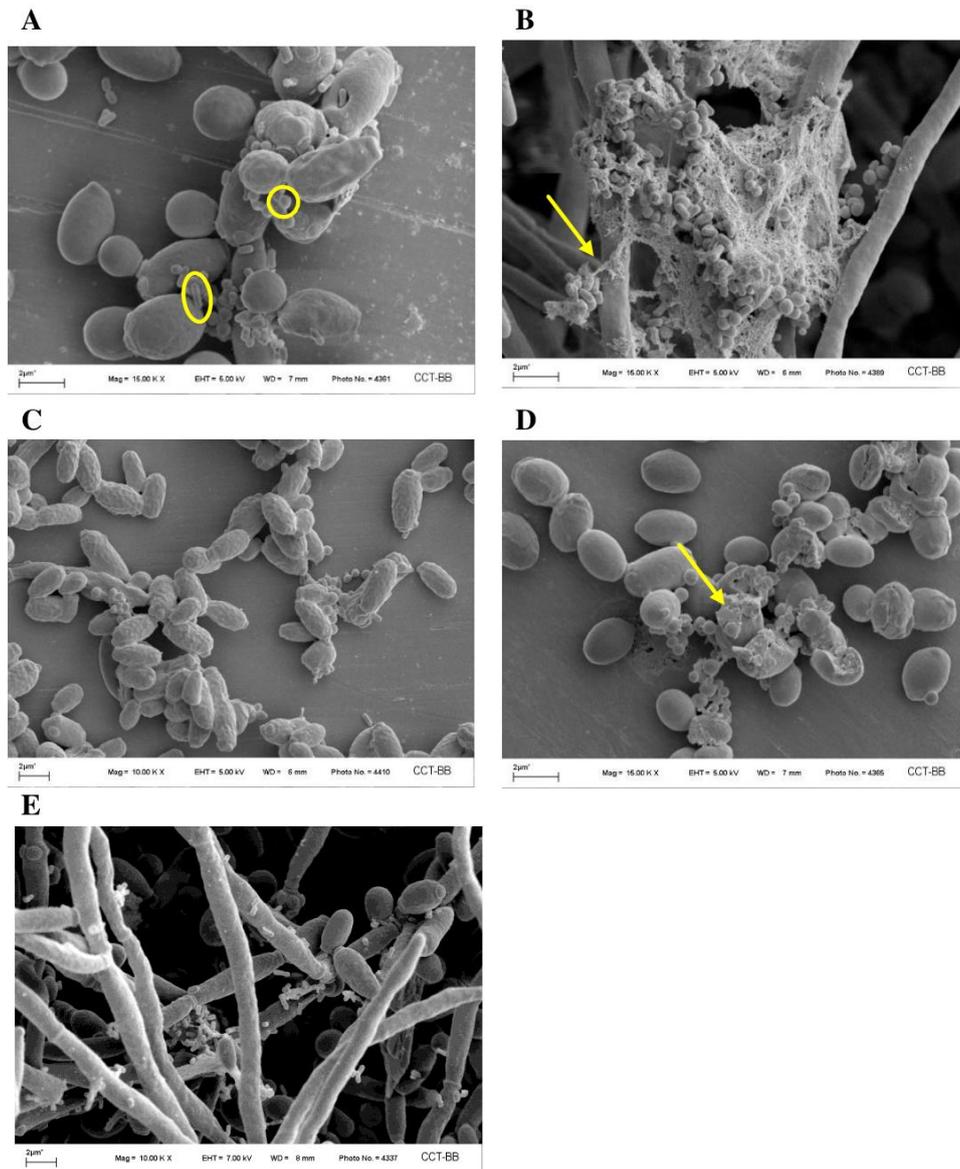
**Tabla 9** Recuento celular de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* en biofilms duales y multiespecie junto con levaduras después de 24 h de contacto en acero inoxidable. Los resultados se expresan como log UFC/cm<sup>2</sup> ± DE.

	Control	Duales			Multiespecie	
		<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefyri</i>	Mezcla de levaduras
<i>L. innocua</i>	6,40±0,08	5,87±0,04***	7,36±0,03***	6,84±0,01**	5,83±0,04***	5,17±0,53***
<i>L. monocytogenes</i>	5,31±0,08	5,65±0,07 <sup>ns</sup>	6,59±0,39*	4,92±0,38 <sup>ns</sup>	5,04±0,09 <sup>ns</sup>	5,08±0,12 <sup>ns</sup>

Las diferencias significativas se refieren al recuento de *Listeria* control y con las levaduras.

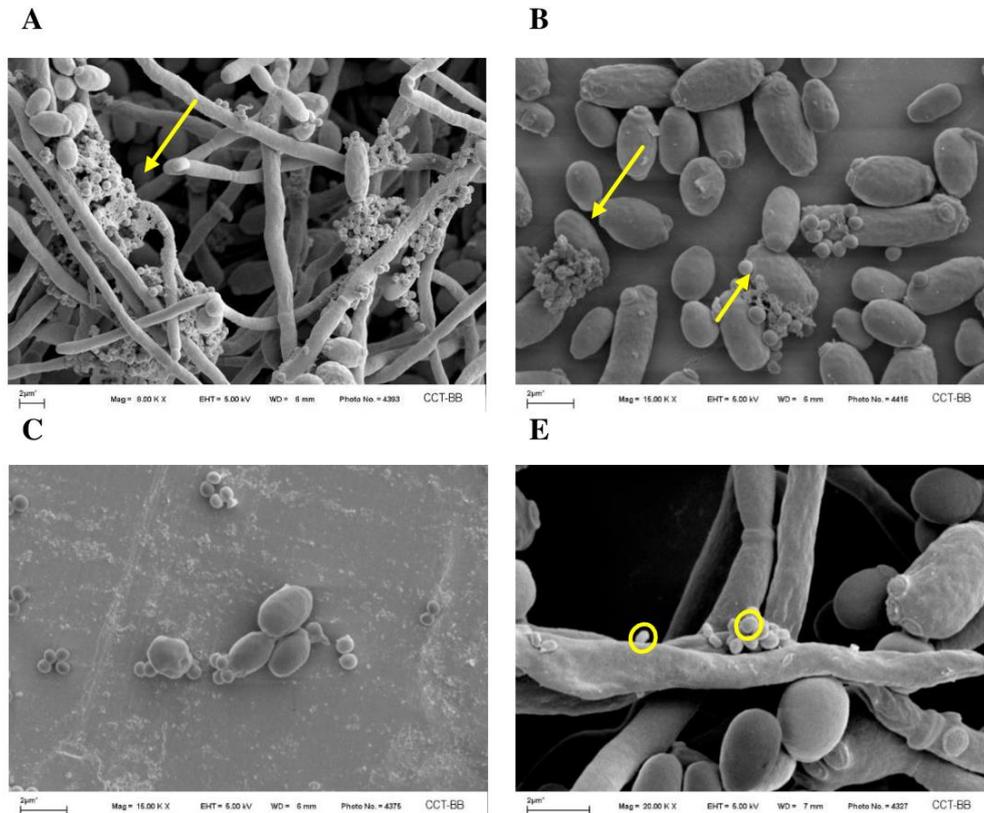
Las imágenes de SEM (**Figura 25**, **Figura 26**) muestran una estrecha asociación entre las células de *Listeria* y de levaduras. En los ensayos de biofilms duales *Listeria-C. tropicalis* se destaca un entramado de fibrillas conectoras y restos de EPS, los cuales actúan como conectores entre bacteria-bacteria y bacteria-levadura. Las células bacterianas se adhieren preferentemente a la superficie de las levaduras, en todos sus estadios morfológicos: blastosporas y pseudohifas. Cabe destacar que la morfología celular de *Listeria* se altera, pasando de una forma de bastón a forma de cocoide (forma redonda).

Debido a que *L. innocua* puede no reflejar con precisión el comportamiento de *L. monocytogenes* en las condiciones y/o alimentos probados, la idoneidad de *L. innocua* como sustituto de *L. monocytogenes* debe ser evaluado caso por caso. Por los resultados obtenidos en la caracterización de la especie, a lo largo de esta tesis, los ensayos se continuaron con *L. monocytogenes*.



**Figura 25** Imágenes de SEM de biofilms duales formados por *Listeria innocua* con cada especie de levadura en acero inoxidable después de 24 h en jugo de manzana. (A) *Listeria innocua* + *R. mucilaginosa*; (B) *Listeria innocua* + *Candida tropicalis*; (C) *Listeria innocua* + *Candida krusei*; (D) *Listeria innocua* + *Candida kefyri*, (E) *Listeria innocua* + mezcla de

levaduras. Con los círculos se señala las diferentes formas de *Listeria* y con las flechas los restos de EPS. Magnificaciones 16.00KX (A, B, D) y 10.00 KX (C, E).



**Figura 26** Imágenes de SEM de biofilms duales formados por *Listeria monocytogenes* con cada especie de levadura en acero inoxidable después de 24 h en jugo de manzana. (A) *Listeria monocytogenes* + *Candida tropicalis*, (B) *Listeria monocytogenes* + *Candida krusei*, (C) *Listeria monocytogenes* + *Candida kefir*, (D) *Listeria monocytogenes* + mezcla de levaduras. Con los círculos se señala las diferentes formas de *Listeria* y con las flechas restos de EPS. Magnificaciones 8.00 KX (A), 16.00 KX (B, C) y 20.00 KX (D).

## I.6 Biofilms sobre membranas de ultrafiltración

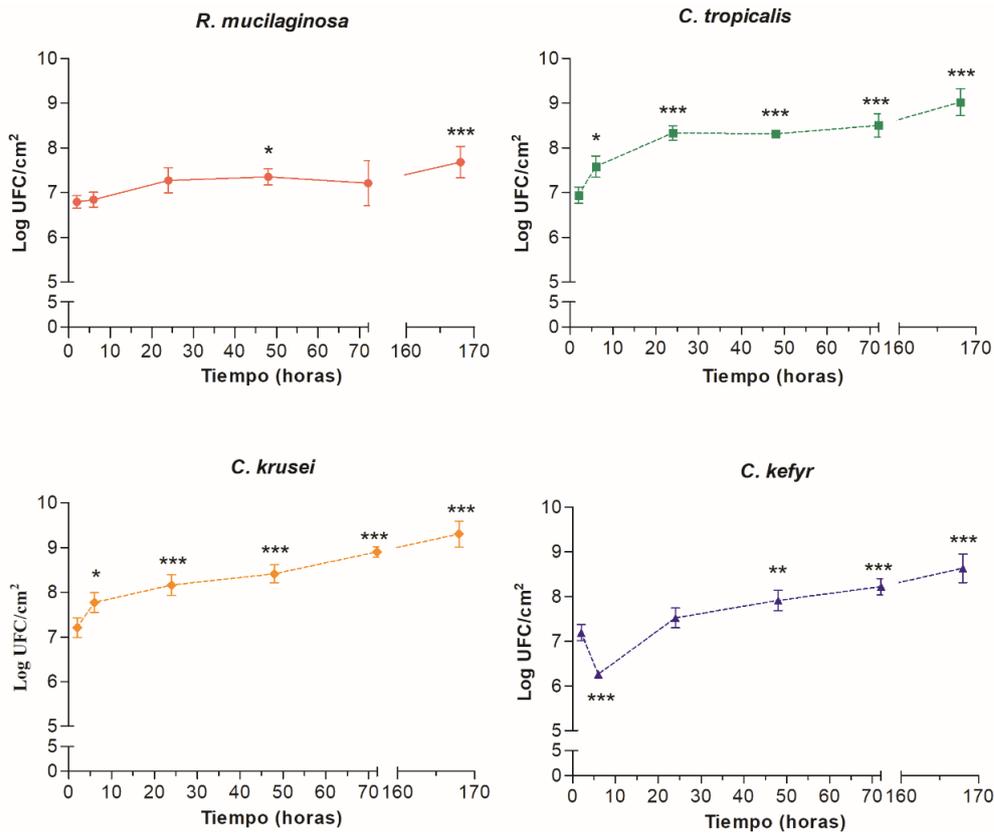
### I.6.1 Formación de biofilms de las levaduras (mono especie y mezcla de levaduras)

La **Figura 27** muestra los valores de adhesión y la formación de biofilms de las levaduras en MUF en seis tiempos diferentes (2, 6, 24, 48, 72, 168 h). Después de 168 h de incubación, *C. tropicalis* y *C. krusei* fueron quienes presentaron mayores valores de adhesión incrementando 2 unidades logarítmicas ( $9,02 \pm 0,30$  y  $9,30 \pm 0,29$  log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente) respecto al tiempo inicial (2 h). *C. kefir* sufrió una reducción significativa después de 6 h, pero incrementó su adhesión 1,44 unidades logarítmicas entre las 2 h y 168 h alcanzando  $8,63 \pm 0,32$  log

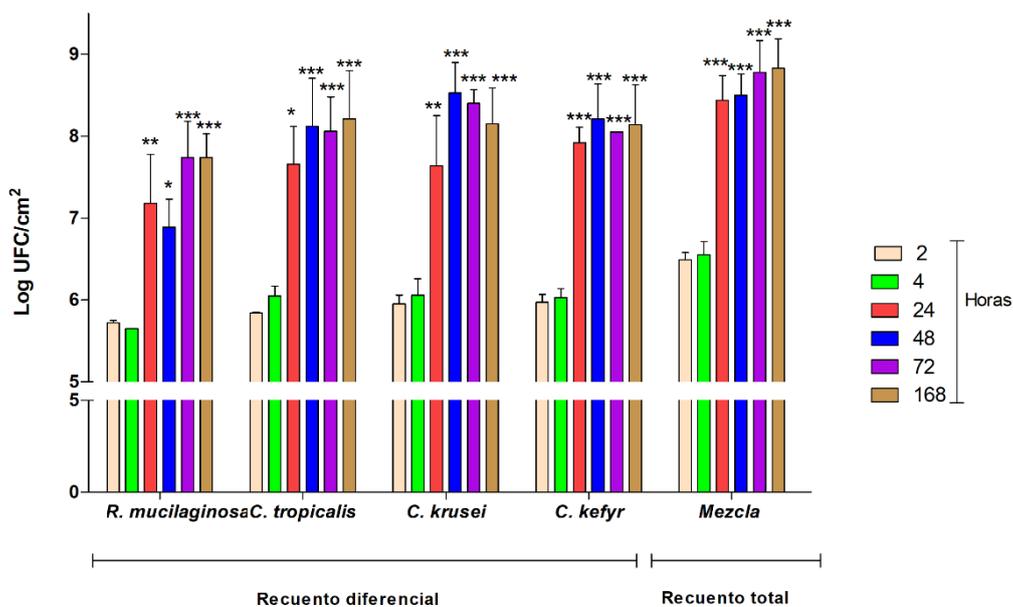
UFC/cm<sup>2</sup>. En comparación con las demás especies evaluadas, *R. mucilaginosa* fue quien menos se adhirió ( $7,68 \pm 0,35 \log \text{ UFC/cm}^2$  a las 168 h), comportamiento que se mantuvo a lo largo del experimento.

Una vez caracterizada la adhesión monoespecie de las levaduras se evaluó la adhesión de la mezcla (**Figura 28**). En la etapa de colonización de la superficie (2 y 6 h) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), pero sí tras 24 y 48 h ( $p < 0,001$ ). Comparando las adhesiones tras 24, 48, 72, y 168 h, estas no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), pero sí cuando se compararon con respecto al tiempo inicial (2 h). Estos resultados dan indicios que la población celular de levaduras alcanza un equilibrio a partir de las 24 h. En cuanto al recuento diferencial en CHROMagar *Candida* (Figura I.16, B) se detectó que las cuatro especies incrementan significativamente sus valores de adhesión después de 24 h y solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre *R. mucilaginosa* y las demás especies (*C. tropicalis*  $p < 0,05$ ; *C. krusei*  $p < 0,01$  y *C. kefyr*  $p < 0,05$ ) después de 48 h de incubación.

Mediante SEM se evidenció la formación de biofilms de la mezcla de levaduras tras 72 h de incubación con la MUF (**Figura 29**). Las levaduras colonizaron toda la superficie, observándose células adheridas tanto a la parte activa de la membrana como a las fibras que actúan como soporte. También es posible detectar sobre las fibras restos de EPS (**Figura 29, A**, rectángulo amarillo), estructuras levaduriformes que atraviesan la superficie y se adhieren a las mismas (ya sea en la parte expuesta como en el interior). Desde la vista superior, es claro cómo se formó un gran entramado celular, principalmente colonizado por las estructuras pseudohifales correspondiente a *C. tropicalis*. Dichas estructuras pueden atravesar la sección transversal del biofilms y conectar las distintas capas de la superficie.

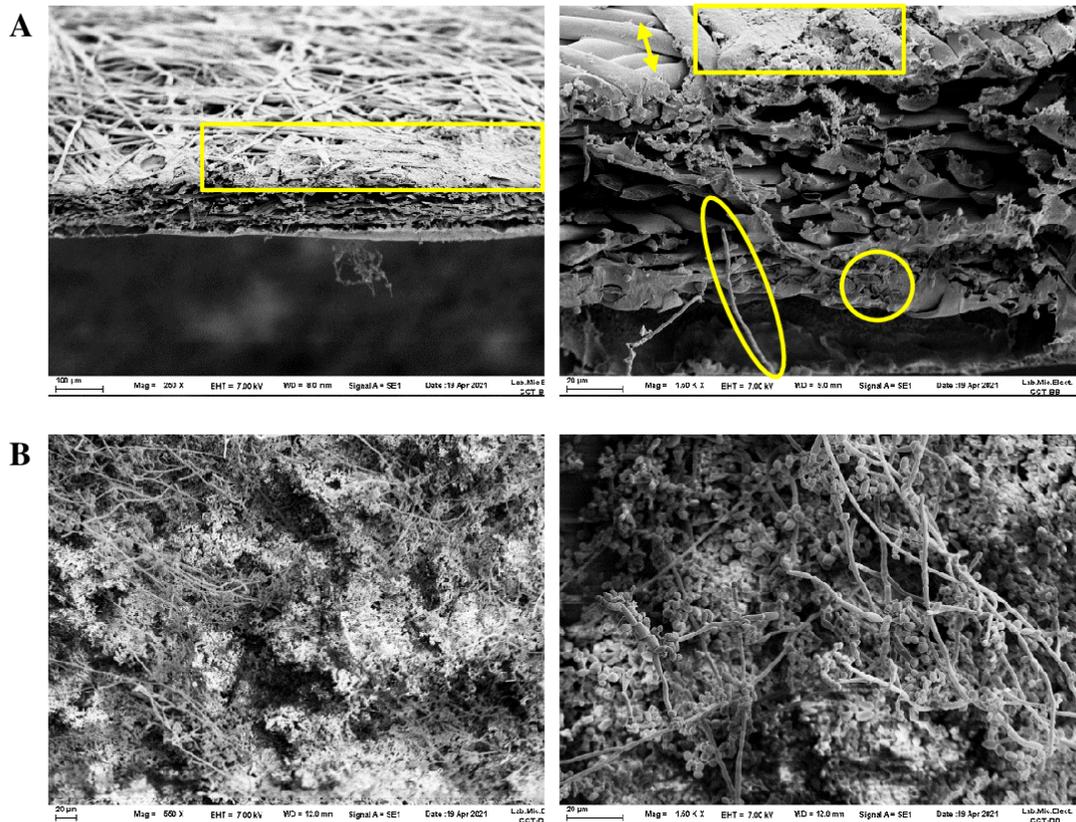


**Figura 27** Biofilms monoespecie de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida kefyr* sobre membranas de ultrafiltración después de 2, 6, 24, 48, 72 y 168 h. Los datos se expresan como log UFC/cm<sup>2</sup> ± DE. Las diferencias significativas se expresan en referencia al tiempo 2 h.



**Figura 28** Recuento total y diferencial de la adhesión de la mezcla de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida kefyr* sobre MUF tras 2, 6, 24, 48, 72 y 168 h de incubación.

Los datos se expresan como  $\log \text{ UFC/cm}^2 \pm \text{ DE}$ . Las diferencias significativas se expresan en referencia al tiempo 2 h.



**Figura 29** Imágenes obtenidas por SEM de los biofilms de la mezcla de levaduras (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* y *Candida kefyr*) formados sobre membranas de ultrafiltración luego de 72 h de incubación. A) vista de la MUF desde un costado; B) vista de la MUF desde arriba. Los rectángulos indican restos de EPS, los círculos señalan las levaduras adheridas a las fibras y las flechas las fibras sin colonizar por las levaduras. Magnificaciones 260 X (A, columna izquierda), 1.60 KX (A, columna derecha), 550 X (B, columna izquierda), 1.60 KX (B, columna derecha).

### 1.6.2 Formación de biofilms multiespecie.

Luego de caracterizar la adhesión y formación de biofilms de levaduras en MUF, se procedió a caracterizar los biofilms en presencia de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7. En la **Tabla 10** se presentan las adhesiones mono especie de las bacterias patógenas pre adaptadas en jugo de manzana y su interacción con la mezcla de levaduras después de 24 y 48

h de contacto en la MUF. En biofilms monoespecie, si bien los recuentos de *S. enterica* y *E. coli* fueron superiores a los de *L. monocytogenes*, todas presentaron valores de adhesión que superaron las 5 unidades logarítmicas UFC/cm<sup>2</sup> después de 24 h.

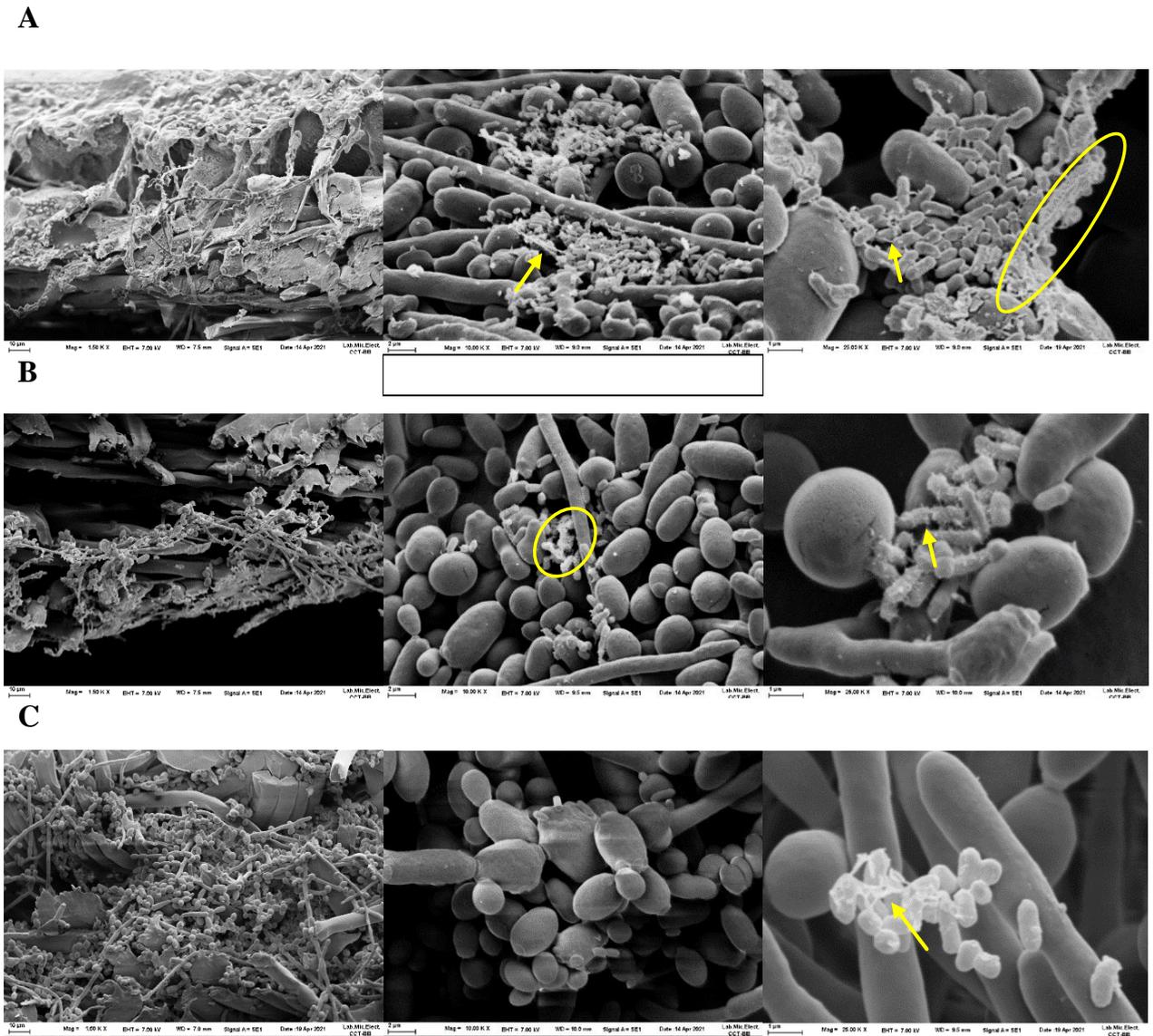
En el caso de los biofilms multiespecie, *L. monocytogenes* incrementó su adhesión 0,79 unidades logarítmicas después de 48 h; el recuento de *S. enterica* disminuyó cerca de 2 unidades logarítmicas (p<0,001) a las 24 h, pero a las 48 h no se observaron diferencias significativas respecto al control (monoespecie), mientras que *E. coli* incrementó su recuento en aprox. 1,5 unidades logarítmicas (p<0,05) después de 24 y 48 h. En el caso de la mezcla de las levaduras, no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en presencia (**Tabla 10**) y ausencia de las bacterias patógenas.

**Tabla 10** Recuento celular de la adhesión mono y multiespecie de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 y de la mezcla de levaduras después de 24 y 48 h de contacto en la membrana de ultrafiltración. Los resultados se expresan como log UFC/cm<sup>2</sup> ± DE.

	Monoespecie		Multiespecie			
	Control		Bacteria		Mezcla de levaduras	
Tiempo (h)	24	48	24	48	48	72
Bacteria:						
<i>L. monocytogenes</i>	5,27±0.87	5,30±0.79	5.04±0.20 <sup>ns</sup>	6.09±0.40 <sup>ns</sup>	8.36±0.39	8.30±0.23
<i>S. enterica</i>	7,60±0,25	7,53±0,15	5.07±0.19 <sup>***</sup>	7.14±0.43 <sup>ns</sup>	8.17±0.31	8.53±0.52
<i>E. coli</i> O157:H7	6,39±0,76	6,23±0,62	7.96±0.30 <sup>*</sup>	7.78±0.43 <sup>*</sup>	8.56±0.11	8.41±0.02

Las diferencias significativas se expresan en referencia a sus respectivos controles.

Las imágenes de SEM (**Figura 30**) ilustran la asociación bacterias y levaduras en MUF después de 48 h. *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* se adhirieron y distribuyeron principalmente sobre la superficie de las levaduras. Las bacterias se organizaron formando acúmulos celulares (microcolonias) con la presencia de apéndices filamentosos, estructuras similares a las fibrillas, los cuales les permiten reforzar la interacción célula-célula y por ende refuerza su adhesión a las levaduras. Estos resultados evidencian nuevamente cómo las estructuras levaduriformes (pseudohifas, blastoporas) funcionan como soportes para el anclaje y adhesión de las bacterias patógenas, siendo un nicho elegible para las mismas.



**Figura 30** Imágenes de SEM de biofilms multiespecie luego de 48 h en membrana de ultrafiltración. Biofilms formado por un preformado de la mezcla de levaduras en presencia de: (A) *Listeria monocytogenes*, (B) *Salmonella enterica* y (C) *Escherichia coli* O157:H7. Las flechas indican las estructuras tipo fibrillas de las bacterias y los círculos restos de EPS. La primera columna corresponde al corte transversal de la membrana. Magnificaciones 1,5 KX (primera fila), 10 KX (segunda fila), 25 KX (A, C tercera fila) y 26 KX (B tercera fila).

## DISCUSION

### I.7 Hidrofobicidad, producción de curli y celulosa y motilidad de *Listeria*

Los recientes brotes de listeriosis relacionados con melones (McCollum et al., 2013), frutas con carozo (Chen et al., 2016) y manzanas caramelizadas (Angelo et al., 2017) han alertado a los organismos implicados en la seguridad alimentaria y reafirmado la necesidad de profundizar en las investigaciones sobre *L. monocytogenes* en ambientes de producción de alimentos a base de frutas. La adhesión de los microorganismos a las superficies y el posterior desarrollo de los biofilms es un proceso multifactorial. Este proceso varía en función de la especie microbiana, las condiciones del ambiente en el que crecen las células (temperatura, pH, presencia de carbohidratos, proteínas y otros nutrientes en la matriz alimentaria o sustancias bactericidas) y la naturaleza del material en estudio (poliestireno, vidrio, AI) (Briandet et al., 1999; Folsom & Frank, 2006; Giovannacci et al., 2000; Moltz & Martin, 2005; Stepanović et al., 2004; Takahashi et al., 2010). Los resultados de este estudio indicaron que ambas especies de *Listeria* son altamente hidrofóbicas a 25 y 37 °C y presentan carácter hidrofílico a 12 °C, revelando que la temperatura influencia sobre el carácter hidrofóbico. Meylheuc et al. (2002) estudiaron las características superficiales de *L. monocytogenes* y *L. innocua*, concluyendo que la cepa no patógena exhibía un carácter electronegativo más marcado y una naturaleza ligeramente más hidrofílica que *L. monocytogenes* lo cual fue similar a lo observado a 37 °C. La adhesión inicial de *L. monocytogenes* implica una relación entre las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular de la bacteria y las propiedades fisicoquímicas de las superficies sólidas a las que se adhiere. Previamente, se ha informado que la afinidad de las superficies bacterianas al acetato de etilo (ácido de Lewis, aceptor de electrones) se correlacionaba con la tasa de adhesión al AI (Briandet et al., 1999). Otros autores han demostrado que existe correlación entre temperatura-hidrofobicidad en especies de *Listeria* (di Bonaventura et al., 2008; Ukuku & Fett, 2002), y encontraron evidencias que relacionaba el carácter hidrofóbico de *Listeria* con la adhesión a superficies (vidrio o superficies de frutas) a temperaturas de 4 o 12°C, pero esta correlación no se evidenciaba a 37 °C. Por otro lado, Takahashi et al. (2010) demostraron que existe correlación entre la hidrofobicidad y la adhesión de *L. monocytogenes* en superficies plásticas de PVC a 20 °C.

Similar a lo que ocurre con la hidrofobicidad, la expresión de apéndices celulares y la motilidad de *Listeria* estuvo relacionada con la temperatura de incubación. A 25 °C, temperatura

relevante para la industria productora de jugo de manzana, tanto *L. innocua* como *L. monocytogenes* presentan movilidad mediante twitching y swimming, y producen curli y celulosa. Como se ha mencionado en *L. monocytogenes*, la biosíntesis de flagelos depende de la temperatura (Schirm et al., 2004). Ciertos autores (di Bonaventura et al., 2008; Djordjevic et al., 2002) no encontraron una correlación positiva entre la capacidad de formar biofilms y la motilidad, independientemente de la superficie utilizada (AI, poliestireno, vidrio). Sin embargo, estos se diferencian de otros investigadores (Gorski et al., 2003; Lemon et al., 2007; Vatanyoopaisarn et al., 2000) quienes postularon que la motilidad mediada por flagelo es considerada crítica para el desarrollo de biofilms de *L. monocytogenes* y, en ausencia de motilidad, los flagelos podrían funcionar como adhesinas en la fijación superficial al AI. Este comportamiento se ha detectado en bacterias como *P. aeruginosa* y *E. coli*, para las cuales se reportó que la motilidad por pili, flagelos o fimbrias es importante para la adhesión y agregación en las superficies, y para el caso de las bacterias grampositivas como *Staphylococcus* spp. son relevantes las adhesinas y proteínas (Girón et al., 2002; O'Toole & Kolter, 1998a). Una de las explicaciones para esto, podría ser que la presencia de fimbrias, flagelos y de polisacáridos (EPS, lipopolisacáridos y celulosa) otorga un carácter hidrofóbico a la superficie celular bacteriana, lo que favorecería la adhesión y formación posterior a las superficies (Bremer et al., 2015; Sutherland, 2001).

Teniendo en cuenta los reportes encontrados en la literatura y sobre la base de los resultados obtenidos, en esta primera parte del capítulo, se puede concluir que, cuando se simularon las condiciones relacionadas con el entorno de procesamiento de jugo de fruta (temperatura, disponibilidad de nutrientes, pH de la matriz alimentaria, etc.), *L. monocytogenes* y *L. innocua* presentan un carácter altamente hidrofóbico, son móviles y producen curli y celulosa. Estas características favorecerían el proceso de adhesión y formación de biofilms.

### **I.8 Supervivencia y adhesión monoespecie de *L. innocua* y *L. monocytogenes***

Como se ha expuesto, para que un microorganismo se adhiera a las superficies en contacto con alimentos, primero debe ser capaz de sobrevivir y crecer en la matriz alimentaria. Con respecto a la supervivencia en jugo de manzana de *L. innocua* y *L. monocytogenes*, se encontró que presentan valores de viabilidad diferente (**Tabla 7**). Por un lado, el recuento celular de *L. innocua* se mantiene estable entre las 2-48 h de incubación, mientras que *L. monocytogenes* reduce su viabilidad después de 48 h. Estos hallazgos fueron consistentes con los informados en frutas y jugos de frutas de diversa acidez (Erkmen, 2000; Glass et al., 2015; Sado et al., 1998). *L. monocytogenes* muestra una significativa adaptabilidad y tolerancia al ambiente

ácido; y esta tolerancia genera una mejora en la supervivencia y la proliferación en alimentos y bebidas (Cotter et al., 2000; Koutsoumanis et al., 2003). La disminución del recuento observada a las 48 h podría deberse a que los mecanismos de adaptación al estrés provocado por las condiciones del ambiente pueden generar cambios en la célula bacteriana que dificultan su detección por la presencia de daños subletales en *L. monocytogenes*. Las células que entran en este estado de latencia en donde no crecen en los medios generalmente empleados para su detección se denominan “viables no cultivables” (VBNC) (Oliver, 2010). Es importante notar que, a pesar de la reducción de la viabilidad tras 24 h de incubación, el recuento de *L. monocytogenes* supera la dosis infecciosa reportada (aprox.  $10^5$ – $10^7$  UFC) (Glass et al., 2015). Al evaluar la adhesión monoespecie, *L. innocua* alcanzó recuentos significativamente mayores sobre AI que *L. monocytogenes* (**Tabla 7**); estas diferencias aumentaron después de 48 h de adhesión, tiempo en el que *L. innocua* se adhirió 1,30 unidades logarítmicas UFC/cm<sup>2</sup> más que *L. monocytogenes*. Es considerable destacar, que ambas especies se adhirieron a la superficie de AI en un breve lapso, en un entorno ácido y con alto contenido de azúcares proporcionado por el jugo de manzana, a 25 °C. Esto es relevante para las industrias de jugos de frutas, sobre todo si se tiene en cuenta los periodos en los que la planta productora no está en funcionamiento. Aunque se ha indicado que las cepas de *Listeria* se adhieren a superficies de AI a niveles más bajos en comparación con otras bacterias grampositivas y gramnegativas (Hood & Zottola, 1997; Jeong & Frank, 1994), se han reportado valores de adhesión variables. Por ejemplo, para *L. monocytogenes*, Gram et al. (2007) reportaron recuentos de  $10^4$  y  $10^5$ – $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> sobre AI en un sistema de caldo de pescado, emulsiones de pescado y carne, respectivamente. Por otro lado, Poimenidou et al. (2009) hallaron recuentos de 3,5 a 5,5 log UFC/cm<sup>2</sup> sobre AI utilizando productos lácteos como matriz alimentaria. En los entornos de producción de alimentos (plantas procesadoras de vegetales y de pescado ahumado) se ha indicado que *L. innocua* tiene mayor incidencia y prevalencia que *L. monocytogenes* (Aguado et al., 2004; Thimothe & Nightingale, 2004). A diferencia, Zhou et al. (2011) empleando el método de cristal violeta determinaron que *L. innocua* es un formador de biofilms más débil en comparación con *L. monocytogenes*. En tanto que Koo et al. (2014) observaron que después de 24 h la adhesión de *L. monocytogenes* fue significativamente mayor que la de *L. innocua*, usando el método de recuento celular en superficies de aluminio y AI, pero no se observaron diferencias significativas entre los biofilms de ambas especies después de 72 h. Algunos investigadores han sugerido que aquellas especies de *L. monocytogenes* pertenecientes al serotipo 1/2c, como es el caso de la cepa de *L. monocytogenes* utilizada en este estudio, exhiben los niveles más altos de adhesión (Lunden et al., 2000; Norwood et al., 2000). En

contraposición, Doijad et al. (2015) analizaron 98 aislados clínicos y alimentarios de *L. monocytogenes* pertenecientes a serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, y no establecieron correlación entre la capacidad de formar biofilms y el serotipo. Di Bonaventura et al. (2008) expresaron que no encontraron diferencias significativas en la formación de biofilms con respecto al linaje genético, la fuente (ambiente vs. alimentos) o el tipo de alimento (pescado vs. carne), independientemente de la temperatura y las superficies analizadas. Las diferencias encontradas en la adherencia de las cepas de *Listeria* analizadas, se las han atribuido a la composición total de ácidos grasos y/o la hidrofobicidad, propiedades específicas de cada cepa que se correlacionan con la capacidad de formar biofilms (Doijad et al., 2015).

Las adhesiones de *Listeria* fueron confirmadas mediante las imágenes obtenidas por microscopía (**Figura 19** y **Figura 20**) las cuales revelan una morfología tipo “panal”. Estas estructuras tipo panal con la formación de espacios intersticiales, los cuales representan canales de agua que promueven la constante circulación de nutrientes y eliminación de residuos (Donlan & Costerton, 2002), se han descrito anteriormente en *L. monocytogenes* por otros autores (Guilbaud et al., 2015; Ripolles-Avila et al., 2018). Se ha demostrado que la formación de biofilms estaba directamente influenciada por el tipo de superficie y material que se empleaba (Mosquera-Fernández et al., 2014; Ripolles-Avila et al., 2018). En dichos estudios, las células de *L. monocytogenes* que presentaban estructuras similares a panales de abejas se formaban en las hendiduras de las superficies de AISI 304 que se crean debido al tratamiento de decapado al que se lo somete, concluyendo que el material y el acabado de la superficie promovían el atrapamiento de células en las primeras etapas de la formación de biofilms. Recientemente (Melián, 2021), se caracterizó la adhesión de *L. monocytogenes* y se observaron diferencias en la estructura y disposición de las células en las biopelículas formadas de acuerdo con las superficies utilizadas. Este autor reportó que sobre AI, el biofilm se desarrolló en las ranuras características del material mientras que, en teflón, las células se agruparon en una red inmersa en la matriz extracelular, lo cual se correlacionaba con observaciones previas de otros autores (Pérez-Ibarreche et al., 2016).

Como síntesis, en esta sección se confirmó que ambas *Listeria* sobreviven en el jugo de manzana y se adhieren sobre la AI. Estos hallazgos, en conjunto con la sección anterior (I.7) sostienen el concepto propuesto por otros autores (Harvey et al., 2007; Nyenje et al., 2012; Poimenidou et al., 2016) que la adhesión y formación de biofilms es un proceso multifactorial, independientemente del origen de aislamiento y del serotipo, y que el impacto del medioambiente resulta condicionante.

## I.9 Formación de biofilms sobre AI y MUF

En las líneas de producción de jugos de manzana se ha descrito que *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefir* forman parte de la comunidad microbiana residente y es inevitable que se encuentren e interactúen con otras especies que pueden ingresar y colonizar el sistema a lo largo de los ciclos de producción (Tarifa et al., 2015, 2017), por lo que es crucial profundizar en el comportamiento que adquieren estas especies en las superficies de uso industrial en contactos con alimentos y como se asocian con posibles patógenos bacterianos que puedan ingresar al sistema. Nuestros resultados confirman que las cuatro especies de levaduras presentan gran afinidad por el AI, y cada especie, un patrón diferente de adhesión (**Figura 22**, **Figura 23**). *C. tropicalis* coloniza rápidamente la totalidad de la superficie, mientras que el resto de las levaduras se distribuyen mayoritariamente en agrupamientos celulares, concatenados unos con otros, recubriendo parcialmente la superficie, distribución que fue detectada por otros autores previamente (Brugnoni et al., 2007; Tarifa et al., 2013, 2015, 2017). En general, las células que pueden formar una red de pseudohifas muestran una mayor adherencia a las superficies inertes, como AI, y pueden ser de gran importancia para la integridad estructural de los biofilms maduros (Zara et al., 2020). Este hecho se puede deber a que las pseudohifas están compuestas por quitina, lo que las convierte en estructuras al menos tres veces más resistente que las blastosporas (Braun & Calderone, 1978; Chaffin et al., 1998; Paramonova et al., 2009). La quitina como material hidrofóbico ha demostrado el aumento de la resistencia mecánica y la flexión en sustitutos óseos (Chen et al., 2005), con lo que se podría concluir que una mayor presencia de pseudohifas en los biofilms, y consecuentemente mayor cantidad de quitina, podría ser el responsable de aumentos en las resistencias de estos a fuerzas externas (Tarifa et al., 2013). *R. mucilaginosa*, *C. krusei* y *C. kefir* no presentan pseudomicelio en su estructura, lo que tiene una notable influencia en la cito-arquitectura y en la composición de los biofilms. En el caso de *R. mucilaginosa*, su arquitectura es similar a la de otras levaduras patógenas no filamentosas, como *C. glabrata* y *Cryptococcus* spp. (Jarros et al., 2019; Fernández Rivero, 2017). En cuanto a los biofilms de la mezcla de levaduras, se observó una notable conformación y consolidación sobre AI a medida que transcurría el tiempo de incubación, siendo evidentes tras 24 h de incubación. Asimismo, se detectó que los valores de adhesión alcanzan un equilibrio (**Figura 22**), este sería entre células viables con sus membranas intactas y células con pérdida de la integridad de la membrana en los biofilms maduros (**Figura 24**). Esto podría significar que el crecimiento de los biofilms alcanza un estado estacionario debido a la concentración de nutrientes u otras condiciones que le resultan como factores

limitantes (Characklis et al., 1990); también podría verse influenciado por el equilibrio que se alcanza entre maduración y desprendimiento en los biofilms ya consolidados.

Tras revisar la evidencia científica disponible hasta la fecha, no se han encontrado datos sobre la formación, las características y el comportamiento de la comunidad microbiana residente en biofilms formados sobre MUF; la bibliografía existente corresponde principalmente a informes previos del grupo (Tarifa et al., 2018a). Por lo que una vez descrita la adhesión sobre AI, se realizaron los ensayos de las levaduras sobre las MUF. En este trabajo, los recuentos demostraron que *C. tropicalis* y *C. kefir* son quienes presentan mayores valores de adhesión a lo largo de los tiempos evaluados (**Figura 27**), lo cual estaría aportando evidencias sobre las ventajas adaptativas de estas especies frente al resto. Por su parte, *C. krusei*, un organismo polimórfico capaz de crecer tanto en forma de pseudohifas o blastosporas, es una de las especies frecuentemente encontradas en estos sistemas, tal como se estableció en Brugnoli et al. (2007) y Tarifa et al. (2017). Al comparar el rango de adhesión de la mezcla de levaduras sobre AI (**Figura 22**) y MUF (**Figura 28**) se observaron recuentos similares ( $p > 0,05$ ). Al igual que lo sucedido con AI, tras 24 h en MUF se alcanzó un equilibrio en cuanto a las células adheridas de las levaduras. Anteriormente, Tang et al. (2009) informaron una adhesión de 7-8 log UFC/cm<sup>2</sup> e Ivnitsky et al. (2007) de hasta 7 log UFC/cm<sup>2</sup> en membranas de nanofiltración, sugiriendo que estos son los valores máximos que podrían detectarse en estas superficies.

Park et al. (2005) mencionan a la topografía de las MUF como un factor importante para la formación de biofilms. Las imágenes de SEM obtenidas después de 72 h (**Figura 29**) de incubación demostró que las especies se adhieren a la parte activa de la membrana y se intercalan con las fibras, destacándose la presencia de pseudohifas correspondiente a *C. tropicalis* (al igual que en AI) y de EPS. Wong et al. (2009) caracterizaron membranas de tipo PVDF-FP100 en donde describió elevaciones de aproximadamente 0,2 µm de extensión lateral y depresiones circulares de 1,5 - 2,5 µm, topografía que mencionan como factible de favorecer el asentamiento de células de levaduras en sus distintas etapas de crecimiento; a esto se suma el hecho del posible pasaje de células a través de los poros.

Un punto importante de este capítulo fue caracterizar los biofilms multiespecie formados sobre AI y MUF, en el cual, la microbiota residente de la industria productora de jugo de manzana (levaduras) se encuentra con bacterias patógenas, consideradas como posibles contaminantes de los jugos de frutas. Se ha postulado que en los biofilms multiespecie, la adhesión ocurre de manera que el microorganismo que primero llega a la superficie y contacta con ella es quien tiende a dominar la situación, iniciando la cooperación o el antagonismo con otras especies, pudiéndose desarrollar distintos modos de interacción según el socio que en cada ocasión

consiga tomar la iniciativa o en función de parámetros predominantes en los entornos de producción (Monds & O'Toole, 2009). En los últimos años se han incrementado los estudios *in vitro* sobre las interacciones de las principales bacterias patógenas transmitidas por los alimentos (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7) con otras bacterias relacionadas con los alimentos, o con miembros de la comunidad microbiana residente que colonizan las superficies de las industrias alimentarias, tanto utilizando modelos de biofilms duales como multiespecie (Alvarez-Ordóñez et al., 2019). Sin embargo, los autores no han encontrado bibliografía que relacione a *Listeria*, *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 con levaduras directamente aisladas de superficies utilizadas en la producción de alimentos y tampoco sobre biofilms multiespecie en MUF.

En este capítulo, al estudiar la formación de biofilms duales y multiespecie, se manifestaron relaciones positivas (ambas especies incrementan su número de células adheridas), negativas (ambas especies disminuyen su número de células adheridas), o incluso neutras (se mantiene el número de células adheridas) en las combinaciones bacteria-levadura. *L. monocytogenes* ha sido considerada como pobre formador de biofilms a largo plazo, pero se sugirió que pueden utilizar un microorganismo colonizador primario para formar biofilms en una superficie determinada (Sasahara & Zottola, 1993). Muchas de las interacciones previamente establecidas entre levaduras y bacterias han resultado en la muerte de uno de los dos microorganismos o de ambos (Brand et al., 2008; Hogan et al., 2004; Kim & Mylonakis, 2011). En la presente investigación, los recuentos de las levaduras han superado los de las bacterias cuando formaban biofilms multiespecie o duales (**Tabla 8**, **Tabla 10**). Sin embargo, se observó que en algunas situaciones la presencia de *Listeria* afectó la adhesión de las levaduras (**Tabla 8**). En los biofilms de ambas *Listeria* con *C. tropicalis*, la levadura no modificó sus recuentos, pero ambas *Listeria* incrementaron sus valores de adhesión, siendo una relación positiva para estas. En los biofilms duales de *R. mucilaginosa* con *L. innocua*, *C. kefir* con *L. innocua* o *L. monocytogenes* y *C. krusei* con *L. monocytogenes*, los recuentos de levaduras disminuyeron sobre AI respecto al control (relación negativa para la levadura), mientras que se observó un incremento de la levadura en el par *C. krusei*-*L. innocua* (relación positiva para la levadura). Respecto al comportamiento de reducir la adhesión de las levaduras se ha informado por otros autores; por ejemplo, Bandara et al. (2009) observaron que *E. coli* ATCC 25922 suprime la adhesión de ciertas especies del género *Candida*: *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Otros autores, reportaron que *E. coli* y *P. aeruginosa* afectan significativamente la formación de biofilms por parte de *C. albicans* (Thein et al., 2006); mientras que se han detectado una

relación positiva entre *E. coli* con *Burkholderia caryophylli* y *Ralstonia insidiosa*, especies aisladas de una planta de procesamiento de productos frescos (Liu et al., 2014).

Por otro lado, en los biofilms multiespecie formados por la mezcla de levaduras + *Listeria* sobre AI, únicamente el recuento celular de *L. innocua* disminuyó en comparación con su control monoespecie (**Tabla 9**). En este caso, se evidenció cómo la adhesión de *Listeria* se modifica dependiendo si forma parte de biofilms duales o multiespecie.

Hasta la fecha, los mecanismos exactos subyacentes a las interacciones levadura-bacteria no han sido dilucidados (de Sordi & Mühlschlegel, 2009; McAlester et al., 2008). Se ha mencionado que la interacción física intra o interespecie se logra a través de los receptores y/o proteínas de la superficie celular. En contraste, las interacciones químicas ocurren debido a la participación de varias moléculas secretoras o intermediarios metabólicos liberados por células fúngicas o bacterianas en el entorno. Este tipo de interacciones son esenciales para la regulación directa o indirecta del crecimiento celular, formación de biofilms y producción de factores de virulencia tanto de las células fúngicas como las bacterianas (Zago et al., 2015). Una posible explicación a la modificación del recuento de *Listeria* podría ser que la mezcla de levaduras crea un sistema complejo mediante la secreción de metabolitos, que junto con las características de la matriz alimentaria podría afectar al comportamiento de la bacteria. En cuanto a esto, se detectó un cambio a nivel morfológico de *Listeria*, la cual alteró su morfología de bastón a forma cocoide (**Figura 19, Figura 20**). Esto concuerda con Gao & Liu, (2014) quienes observaron el mismo cambio morfológico en células de *L. monocytogenes* pos-exposición a compuestos desinfectantes. Los autores concluyeron que esta modificación morfológica podría ser considerada como una respuesta al estrés del ambiente, y esto podría estar relacionado con que las bacterias fueron inducidas a un estado VBNC. En nuestro estudio podría suponerse que el estrés generado por el pH ácido y por los metabolitos generado por las levaduras en la matriz alimentaria podría afectar la morfología de *Listeria* en las condiciones evaluadas. Cuando las células de *L. monocytogenes* estuvieron en contacto previamente con el jugo de manzana durante 4 h, este cambio de morfología no fue tan evidente (**Figura 30**). Estos resultados en conjunto demuestran el potencial de *L. monocytogenes* para alterar su fisiología celular durante la exposición a condiciones de estrés (contacto repetido con jugo de manzana), lo que puede contrarrestar la eficacia de la conservación de alimentos, y por ende, comprometer la seguridad alimentaria (Koutsoumanis et al., 2003).

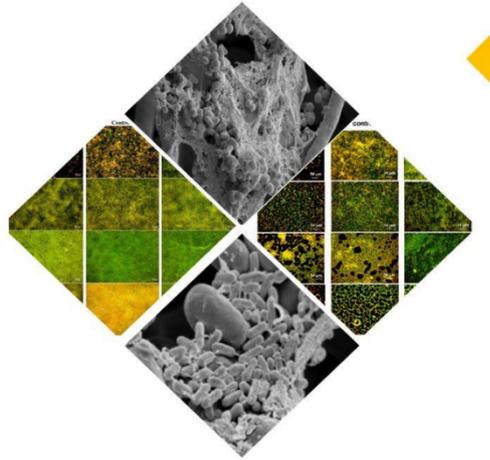
Las imágenes de SEM correspondiente a los biofilm duales (**Figura 25 y Figura 26**) demuestran cómo *Listeria* encuentran un nicho específico en las superficies de las levaduras, las cuales están en mayor proporción colonizando la superficie, y cómo se forman conexiones

intraespecie (*Listeria* - *Listeria*) e interespecie (*Listeria* - levaduras). La preferencia de las bacterias por la superficie de las células levaduriformes concuerda con lo reportado por diferentes autores, los cuales informaron que, dentro de un variado número de especies bacterianas, algunas presentaban preferencia por hifas de la especie *C. albicans*, entre ellas *C. pyrogenes* y *Acinetobacter baumannii* y que *C. albicans* interactúa con *Streptococcus* spp. y *Pseudomonas* spp. (Bamford et al., 2009; Peleg et al., 2008), ya sea física o químicamente, en diferentes hábitats (Fourie et al., 2016; Koo et al., 2018). Un factor que podría afectar las interacciones célula-célula es la agregación entre las especies. En nuestros resultados se observó que tanto las bacterias como las levaduras incrementan sus valores de agregación cuando están en presencia de la otra especie (**Tabla 5**). Tarifa et. al. (2014, 2017) plantearon conclusiones similares, reportando un comportamiento semejante en *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. en presencia de *C. tropicalis* y *C. kefyri*, respectivamente. En estos estudios, las imágenes obtenidas por microscopía óptica revelaron interacción directa entre células de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. con ambas especies de levaduras en el proceso de agregación; estas interacciones también fueron observadas a partir de las imágenes de SEM y están relacionadas con el desarrollo de biofilms a partir de las interacciones inter e intraespecie (Giaouris et al., 2015).

En conclusión, los hallazgos de este trabajo confirman la hipótesis propuesta: las levaduras, principales colonizadoras de las superficies de uso alimentario, les ofrecen a las bacterias grandes áreas de superficie de adhesión que le permiten anclarse y persistir en estos microambientes. Los resultados sobre los biofilms duales y multiespecie sobre AI y MUF sustentan la idea de que *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 toman ventajas de las interacciones con aquellos microorganismos fuertes formadores de biofilms para permanecer en ambientes que pueden ser hostiles. *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 encuentra un “nicho elegible” en la superficie de levaduras, en las condiciones evaluadas, lo que sugiere diversas interacciones entre las especies que hacen posible la convivencia en esta comunidad compleja.

Parte de los resultados obtenidos en este capítulo conforman el manuscrito:

“Multispecies biofilms between *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* with resident microbiota isolated from apple juice processing equipment”. Agustín, M. D. R., & Brugnoli, L. (2018). *Journal of Food Safety*, 38(5). <https://doi.org/10.1111/jfs.12499>



# CAPITULO II

ESTRATEGIAS DE BIOCONTROL EMPLEANDO BACTERIAS ÁCIDO-  
LÁCTICAS

## CAPITULO II. ESTRATEGIAS DE BIOCONTROL EMPLEANDO BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

### HIPOTESIS

- La presencia de bacterias ácido-lácticas (BAL) adheridas sobre superficies de uso alimentario mitiga la formación de biofilms de bacterias patógenas transmitidas por alimentos.

### OBJETIVOS

- Evaluar y caracterizar la supervivencia en jugo de manzana y la adhesión sobre acero inoxidable de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393.
- Evaluar estrategias de biocontrol (competencia y exclusión) mediante biofilms formados por *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* sobre acero inoxidable para disminuir la supervivencia y la adhesión de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7.

## INTRODUCCIÓN

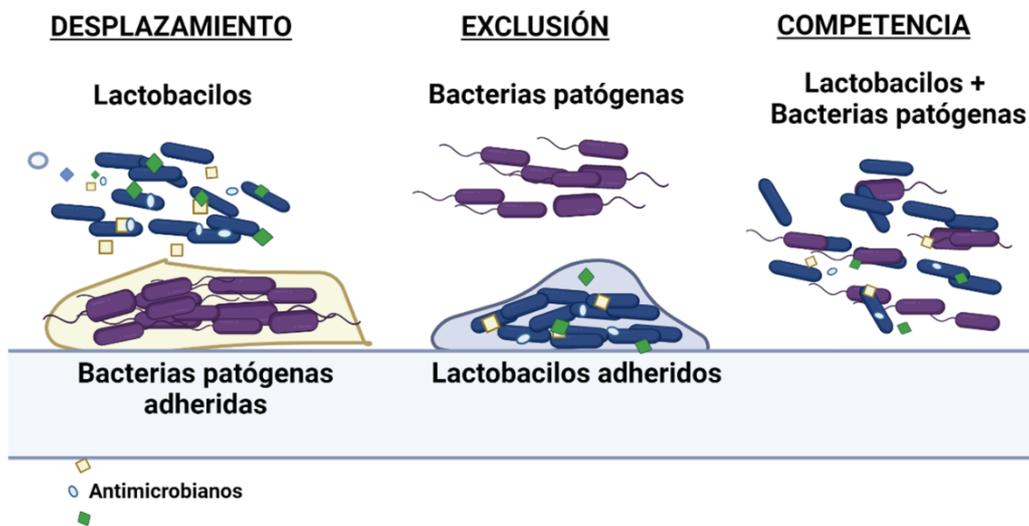
Las BAL se han reportado como buenas candidatas para formar biofilms protectores en superficies de la industria alimentaria, y así controlar la colonización de bacterias patógenas como *L. monocytogenes* (Castellano et al., 2017; Speranza et al., 2009; Zhao et al., 2013). La selección de moléculas microbianas y/o cepas bacterianas no patógenas, que producen compuestos antimicrobianos, puede ayudar a controlar, prevenir o erradicar patógenos no deseados en la industria alimentaria (da Silva Sabo et al., 2014; Silveira et al., 2019).

La modificación de las propiedades fisicoquímicas de las superficies sólidas, la competencia por los nutrientes y / o la producción de compuestos antimicrobianos se encuentran entre los enfoques actuales evaluados para la inhibición de patógenos. La adhesión de BAL bacteriocinogénicas sobre superficies presentó ventajas con respecto al acondicionamiento de la superficie con bacteriocinas, por limitar el suministro de nutrientes e inhibición competitiva (Castellano et al., 2017). Las estrategias propuestas para las BAL con el objetivo de mitigar la proliferación de bacterias no deseadas sobre superficies son desplazamiento, exclusión y competencia (**Figura 31**). En el desplazamiento, las BAL y sus metabolitos son capaces de desencadenar una dispersión celular a partir de biofilms ya formados (Gutiérrez et al., 2016). En la estrategia de exclusión competitiva, una especie microbiana compete exitosamente con otra/s especie/s por nutrientes y/o espacio en un hábitat, reduciendo el número de células o excluyéndolas (Hibbing et al., 2009; Khaneghah & Fakhri, 2018). Este concepto ha sido designado como biocontrol cuando la aplicación es antagónica hacia un determinado patógeno (Gatesoupe, 1999). La exclusión puede ser el resultado de la producción de antimicrobianos como bacteriocinas, péptidos, ácidos orgánicos y/o biosurfactantes, que actúan directamente sobre las especies con las que compiten, limitando la supervivencia o proliferación de estas.

Hascoët et al. (2021) y Tousehik et al. (2021) propusieron dos posibles hipótesis sobre el efecto que un biofilm preformado de BAL podría tener sobre los patógenos: (i) hipótesis de interacciones inespecíficas (competencia, desplazamiento y exclusión), en la que los biofilms preestablecidos de otros microorganismos afectan a la implantación del patógeno en la superficie ocupando el espacio disponible; y (ii) hipótesis de competencia específica en la que los microorganismos preexistentes afectan al desarrollo del biofilm de los patógenos compitiendo por nutrientes o produciendo sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, compuestos anti quorum sensing, enzimas, entre otros.

Previamente, se ha reportado que las estrategias de exclusión y competencia por *Lb. sakei* CRL1862 evitan mejor la adhesión de *L. monocytogenes* que la estrategia de desplazamiento

(Pérez-Ibarreche et al., 2016). Esta observación fue consistente con investigaciones anteriores, quienes hallaron que el efecto mediado por BAL fue menos efectivo en pos que en pretratamientos (Tahmourespour & Kermanshahi, 2011; Woo & Ahn, 2013). Asimismo, se ha reportado que la agregación de las especies de BAL, juega un rol importante, ya que la capacidad de coagregación de distintas especies de *Lactobacillus* interfiere con la habilidad de colonizar de los patógenos alimentarios y con la reducción del número de células viables de los mismos (Collado et al., 2007; del Re et al., 2000; García-Cayuela et al., 2014; Savard et al., 2011; Vlková et al., 2008).



**Figura 31** Esquema de estrategias de especies de *Lactobacilos* en presencia de bacterias patógenas. (Adaptado de Pérez-Ibarreche 2017).

Al considerar el uso de BAL como estrategia de biocontrol en alimentos o en superficies que entran en contacto con ellos, uno de los principales obstáculos a tener en cuenta es asegurar su crecimiento y supervivencia en el entorno alimentario donde deberán ejercer su efecto. La mayoría de los estudios existentes sobre jugos de frutas se centran en la incorporación de probióticos para obtener alimentos funcionales (Patel, 2017), pero existen pocos informes sobre el empleo de BAL como estrategia de biocontrol contra patógenos de alimentos en esta matriz. Se considera relevante entonces estudiar cómo interactúan las BAL y las bacterias patógenas en un ambiente *in situ*, en el cual las condiciones (como pH, temperatura, tipo de matriz alimentaria, superficies de adhesión, cepa a estudiar) pueden influir en el rendimiento de las bacterias antagonistas y su efectividad.

El grupo *Lb. casei*, compuesto principalmente por las especies estrechamente relacionadas *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus*, se encuentra entre algunas de las especies BAL más investigados debido a su aplicabilidad en las industrias alimentaria, biofarmacéutica y médica (Hill et al., 2018). En consecuencia, en este capítulo se efectuaron estudios para evaluar posibles estrategias de prevención o inhibición de bacterias patógenas alimentarias usando dos especies reconocidas de *Lactobacillus*: *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 y *Lb. casei* ATCC 393 en un sistema que imita las condiciones de producción de jugos de frutas. El primer objetivo del capítulo se centró en caracterizar las especies de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 y *Lb. casei* ATCC 393 mediante su actividad antibacteriana, agregación, supervivencia y adhesión en jugo de manzana. Como segundo objetivo se planteó evaluar el efecto antagónico mediante las estrategias de exclusión y competencia de las BAL frente a *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157: H7 durante la colonización sobre AI en jugo de manzana como matriz alimentaria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se emplearon suspensiones de  $10^8$  UFC/ml de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103, y *Lb. casei* ATCC 393 (preparadas según lo descrito en la sección 9.3) y suspensiones de  $10^4$  UFC/ml de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157: H7 (sección 9.2). El inóculo seleccionado de las bacterias patógenas se seleccionó ya que podría acercarse a valores más representativos. La superficie de adhesión empleada en este capítulo fue AI. Seguidamente, se brindarán detalles de las metodologías empleadas para caracterizar y evaluar el efecto antagonico de las BAL.

### II.1 Caracterización de las BAL

#### II.1.1 Actividad antimicrobiana

Se seleccionó la técnica de difusión en agar para evaluar la actividad antimicrobiana de *Lb. rhamnosus*, y *Lb. casei* frente a *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7. La técnica de difusión es adecuada para diferenciar a las especies evaluadas en tres categorías: susceptible, intermedia y resistente, según el tamaño del halo de inhibición que presentan (Mishra & Prasad, 2005).

Los cultivos de las BAL se prepararon en 10 ml de caldo MRS durante 48 horas a 37 °C. Los sobrenadantes se extrajeron por centrifugación a 2.000 x g (Labofuge 200, Kendra, Alemania) durante 15 min y se filtraron utilizando membranas de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m (Millipore, EE. UU.). Tomando como referencia la metodología informada por Tomás et al. (2003, 2004), el sobrenadante libre de células se dividió en tres partes iguales para su tratamiento: 2,5 ml se neutralizaron con NaOH 5 N hasta alcanzar un pH de 7; 2,5 ml se trataron con calor a baño maría durante 1 hora a 25 °C y la porción restante se usó sin tratar (extracto crudo). Al sobrenadante crudo se le midió el pH empleando tiras indicadoras de 0-6,0 (MColorpHast, Alemania). El caldo MRS sin inocular tratado de igual manera que los sobrenadantes de BAL fue el control negativo, para descartar la posible actividad inhibitoria del medio.

Para preparar las suspensiones de las bacterias patógenas, se inocularon tubos con 20 ml de PCA, fundido y enfriado a 48 °C, con 200  $\mu$ l de los cultivos ajustados ( $\sim 10^8$  UFC/ml) de *L. monocytogenes*, *S. enterica* o *E. coli*. Luego, el medio inoculado se colocó en cajas de Petri estériles y una vez solidificado, se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro con sacabocados estériles. Los pocillos se llenaron con 35  $\mu$ L de cada sobrenadante de BAL libre de células: a)

extracto crudo, b) neutralizado y c) tratado con calor. Las placas se incubaron a 4 °C durante 12 h para permitir la difusión de los sobrenadantes en el agar y posteriormente a 35 °C durante 48 h. El diámetro de la zona de inhibición (zona clara alrededor de cada pocillo) se registró en mm y se expresó como  $\text{mm} \pm \text{DE}$ .

### II.1.2 Agregación

Como se indicia en el Capítulo I (sección I.1.4), se evaluó la autoagregación de las especies *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7, y la coagregación entre cada BAL y cada bacteria patógena en PBS. Se midió la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  a tiempo inicial (0 h) y el tiempo final (24 h) incubándose a 25 °C. Tras 24 h de incubación, se tomó una muestra del fondo de la cubeta para ser analizada por microscopía óptica, previa tinción de GRAM. Los resultados se expresaron como % A y % CA.

## II.2 Supervivencia, adhesión y efectos antagónicos de BAL

Inicialmente, se evaluó la capacidad de supervivencia en jugo de manzana de *Lb. casei* y *Lb. rhamnosus*. Cada suspensión ajustada de BAL se puso en contacto con jugo de manzana por 24-48 a 25 °C, después de este tiempo, las muestras se analizaron por recuento en placa. En este caso, los datos se expresaron como  $\log \text{UFC/ml} \pm \text{DE}$ .

El efecto de las BAL frente a *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 se evaluó en diferentes condiciones: en cultivos planctónicos (CP) y en biofilms. En este último caso, mediante ensayos de co-adhesión y biofilms preformados de BAL sobre AI, a fin de estudiar estrategias de competencia y exclusión, respectivamente. Para los ensayos de CP, las suspensiones de *Lb. rhamnosus* o *Lb. casei* se combinaron en una proporción 1:1 en tubos de ensayo estériles con cada bacteria patógena. Para los ensayos de competencia, la combinación de las suspensiones se agregó en simultáneo sobre la superficie de AI y se incubaron 24-48 h a 25 °C. En el caso del ensayo de exclusión, la especie antagónica (BAL) se adhirió al AI por 24 h para obtener un biofilm preformado, previo a la adición de células planctónicas de cada patógeno en estudio. En los estudios de adhesión, pasado el tiempo de incubación, el sobrenadante se descartó cuidadosamente y la superficie con las células adheridas restantes se enjuagó dos veces con PBS.

Se evaluaron las siguientes combinaciones:

- (i) *Lb. casei* o *Lb. rhamnosus* + *E. coli* O157:H7;
- (ii) *Lb. casei* o *Lb. rhamnosus* + *S. enterica*;

(iii) *Lb. casei* o *Lb. rhamnosus* + *L. monocytogenes*.

Simultáneamente, se realizaron los controles de las adhesiones mono especie de las bacterias patógenas y las BAL durante 24 y 48 h.

Pasado el tiempo de incubación correspondiente, las muestras se analizaron mediante recuento en placa. Los datos se expresaron como log UFC/cm<sup>2</sup>±DE. Por su parte, el efecto inhibitor de BAL hacia los patógenos se calculó de acuerdo con lo reportado por Iglesias et al. (2017). Las reducciones de la población se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{Reducción log UFC/cm}^2 = \log N_P - \log N_{P+L. rhamnosus \text{ o } L. casei}$$

donde  $N_P$  es el log CFU/cm<sup>2</sup> del control de *L. monocytogenes*, *S. enterica* o *E. coli* O157:H7 y  $N_{P+L. rhamnosus \text{ o } L. casei}$  es el resultado de la adhesión o las células libres después de exponerse a la presencia de BAL.

### II.2.1 Análisis fisicoquímico

Para evaluar el cambio fisicoquímico que las BAL podrían tener sobre la matriz alimentaria, se procedió a analizar diferentes parámetros, tales como pH, °Brix, acidez titulable (AT) y turbidez. Para ello, se siguió el sistema detallado en Tarifa et al. (2018) con algunas modificaciones. Se utilizó un sistema compuesto por vasos de precipitados en los que se colocaron superficies en forma de disco (50 mm de diámetro, 0,5 mm de espesor; AISI 304, grado alimenticio) que se utilizaron para la formación de biofilms de *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei*. Los vasos de precipitados se llenaron con 250 ml de cada suspensión ajustada de BAL durante 24, 120 y 168 h. Luego, las superficies con biofilms preformados de BAL se trasladaron a otros vasos de precipitados estériles y se les añadió jugo de manzana fresco; las muestras se incubaron durante 48 h más.

Para determinar el pH se empleó un medidor de pH digital Hana HI5521 (Hanna Instruments SL, Gipuzkoa, España) calibrado con soluciones tampones a pH 4.0 (Merck) y 7.0 (Cicarelli). Para la determinación de la acidez se usó el método AOAC n.º 16,023 titulando con solución de NaOH 0,1 N y expresada como porcentaje de ácido láctico (AOAC, 1984). Los °Brix se determinaron con un refractómetro digital WYA Abbe como se mencionó anteriormente y la turbidez se midió con un turbidímetro portátil Velp Scientifica TB1.

## RESULTADOS

### II.3 Caracterización de las BAL

#### II.3.1 Efecto inhibitorio de los sobrenadantes

La **Tabla 11** presenta la actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células crudos y expuestos al calor frente a *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7. Los sobrenadantes neutralizados no presentaron actividad inhibitoria frente a las bacterias patógenas ensayadas, por lo que los datos se han omitido en la tabla. Por otro lado, se observó que el sobrenadante crudo de las BAL presenta actividad inhibitoria frente a las tres bacterias patógenas. *L. monocytogenes* fue la especie más susceptible de las tres especies, con halos de inhibición >15 mm. En cuanto al efecto de los sobrenadantes tratados por calor, si ordenamos según su mayor a menor susceptibilidad, se observó que *L. monocytogenes* > *S. enterica* > *E. coli*.

**Tabla 11** Efecto inhibitorio de los sobrenadantes tratados de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 sobre *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7.

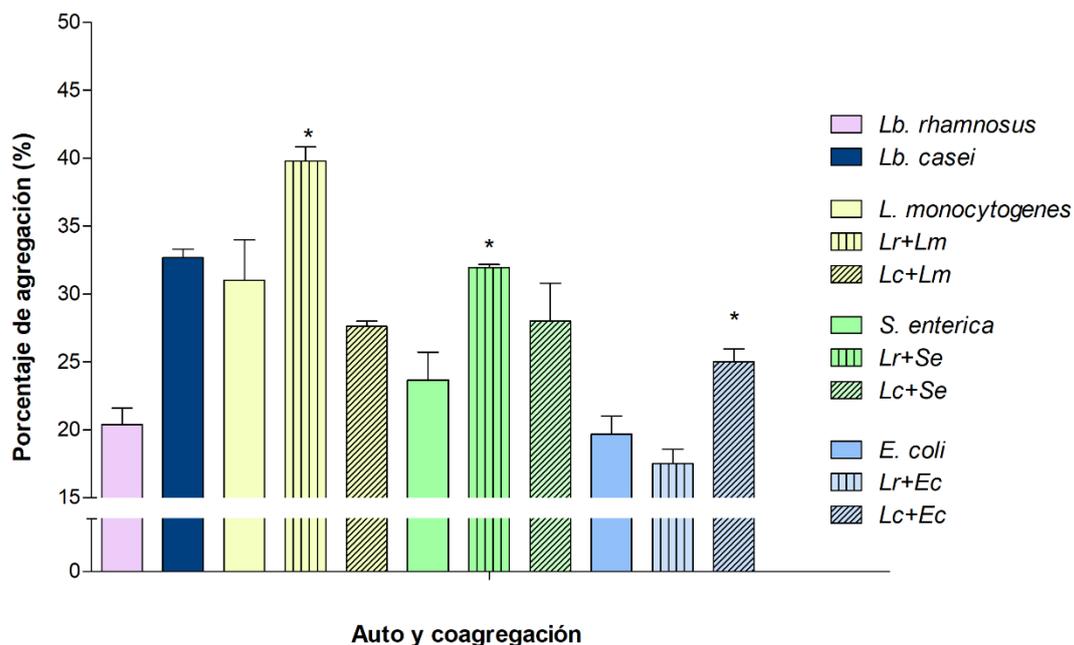
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. enterica</i>		<i>E. coli</i> 0157:H7	
	Crudo	Calor	Crudo	Calor	Crudo	Calor
<i>Lb. rhamnosus</i>	+++	—	++	+	+	—
<i>Lb. casei</i>	+++	+++	+	+	+	—

Halo claro: + = 6,0 – 10 mm, ++ = 10,1 - 15,0 mm, +++ = más de 15,0 mm. El sobrenadante neutralizado no genero efecto inhibitorio.

#### II.3.2 Agregación

Ciertos lactobacilos pueden prevenir la adherencia de bacterias patógenas a superficies mediante la autoagregación que forma una barrera física o por coagregación con los patógenos (Collado et al., 2008). La **Figura 32** revela los valores de autoagregación, que por lo general fueron superiores al 20 %, siendo *Lb. casei* y *L. monocytogenes* quienes alcanzaron valores mayores al 30 %. Al comparar la autoagregación de las dos BAL, se halló una diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) de agregación del 10 % entre *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei*, siendo el valor de esta última mayor. Para el caso de las bacterias patógenas, solo la diferencia de agregación entre *L. monocytogenes* y *E. coli* fue significativa ( $p < 0,05$ ) tras 24 h de incubación.

En cuanto a la coagregación, los porcentajes variaron según la combinación de bacteria patógena y especie de BAL evaluada. El mayor porcentaje de coagregación encontrado fue para el par *L. casei* + *L. monocytogenes* (40 %), mientras que el par *Lb. rhamnosus* + *E. coli* no superó el 20 %. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre el porcentaje de autoagregación de *Lb. casei* y el porcentaje de coagregación de cada bacteria patógena. Sin embargo, sí se detectaron diferencias ( $p < 0,05$ ) al comparar la autoagregación de *E. coli* con la coagregación con *Lb. casei*. Además, se encontraron diferencias significativas al comparar la autoagregación de *Lb. rhamnosus* con la coagregación con *L. monocytogenes* ( $p < 0,001$ ), que alcanzó el máximo valor (40 %), y con *S. enterica* ( $p < 0,01$ ), que incrementó el porcentaje hasta 32 %.

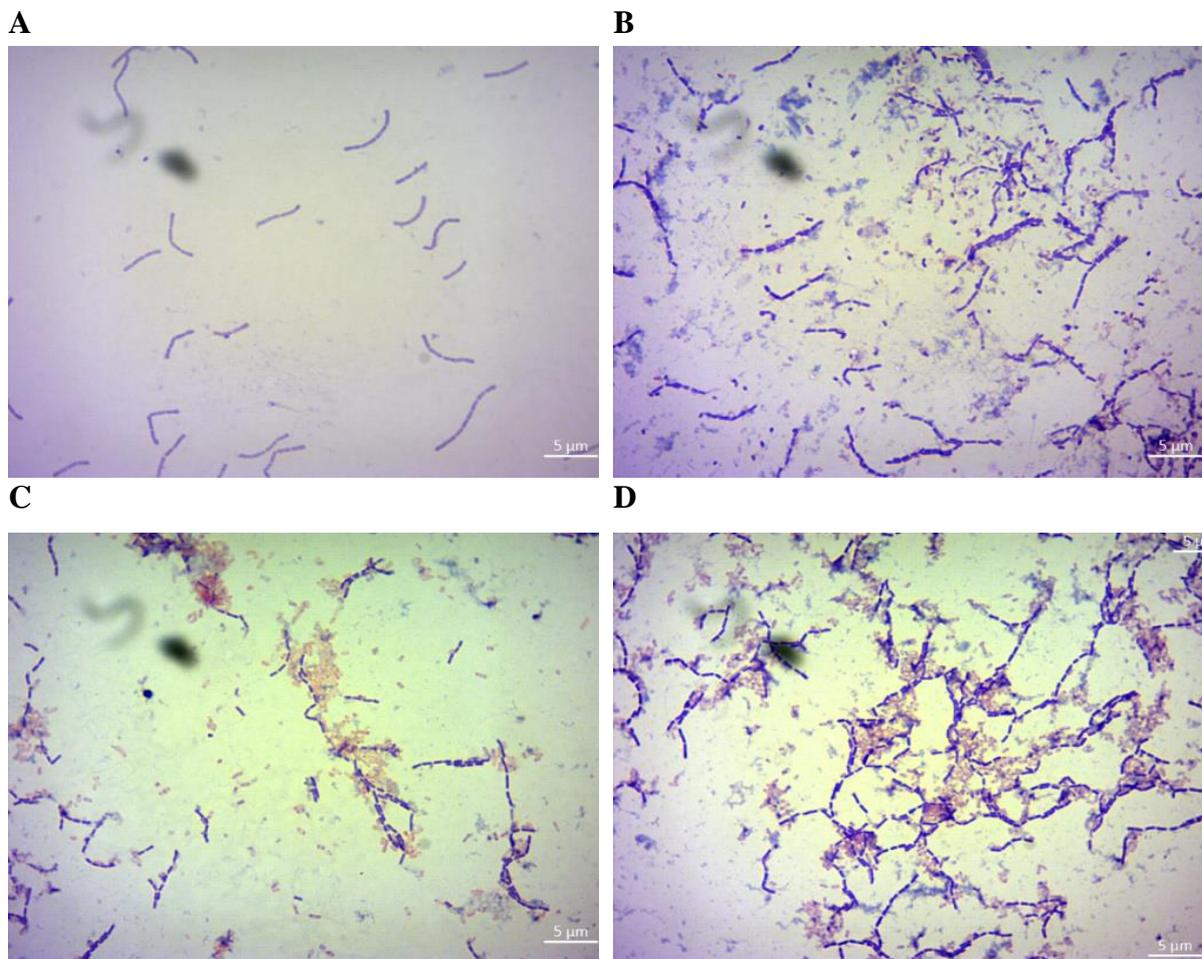


**Figura 32** Porcentaje de auto y coagregación de *Lactobacillus rhamnosus* (Lr), *Lactobacillus casei* (Lc), *Listeria monocytogenes* (Lm), *Salmonella enterica* (Se) y *Escherichia coli* O157:H7 (Ec) tras 24 h en PBS.

Los datos se expresan en % de agregación  $\pm$  DE. Las diferencias significativas comparan la autoagregación de *Lm*, *Se* y *Ec* con la coagregación con *Lr* y *Lc*.

Una vez finalizado el ensayo (24 h) se tomaron muestras de la parte inferior de las cubetas para ser analizadas por microscopía óptica, previa tinción de Gram. En la **Figura 33** se muestran de forma representativa las agregaciones de *Lb. rhamnosus* y su combinación con cada patógeno. En los casos de coagregación las bacterias patógenas se adhieren y forman acúmulos celulares alrededor de las células de *Lactobacillus*, esto también se observa con *E. coli* O157:H7 a pesar

de que el porcentaje de coagregación fue menor en comparación con *L. monocytogenes* ( $p > 0,001$ ) y *S. enterica* ( $p > 0,001$ ).



**Figura 33** Imágenes de microscopía óptica (tinción de Gram) de cultivos agregados de (A) *Lactobacillus rhamnosus* y su coagregación con (B) *Listeria monocytogenes*, (C) *Salmonella enterica* y (D) *Escherichia coli* O157:H7. Aumento: 100X.

## II.4 Caracterización de las BAL en jugo de manzana

### III.4.1 Supervivencia y adhesión

La **Tabla 12** presenta los valores de supervivencia y adhesión sobre AI de *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* después de 24 y 48 h de incubación. Los resultados demuestran que ambas especies son capaces de mantener su viabilidad en jugo de manzana después de 48 h y que ambas se adhieren al AI. En los CP se observó una disminución de 2 y 1,4 unidades logarítmicas en *Lb.*

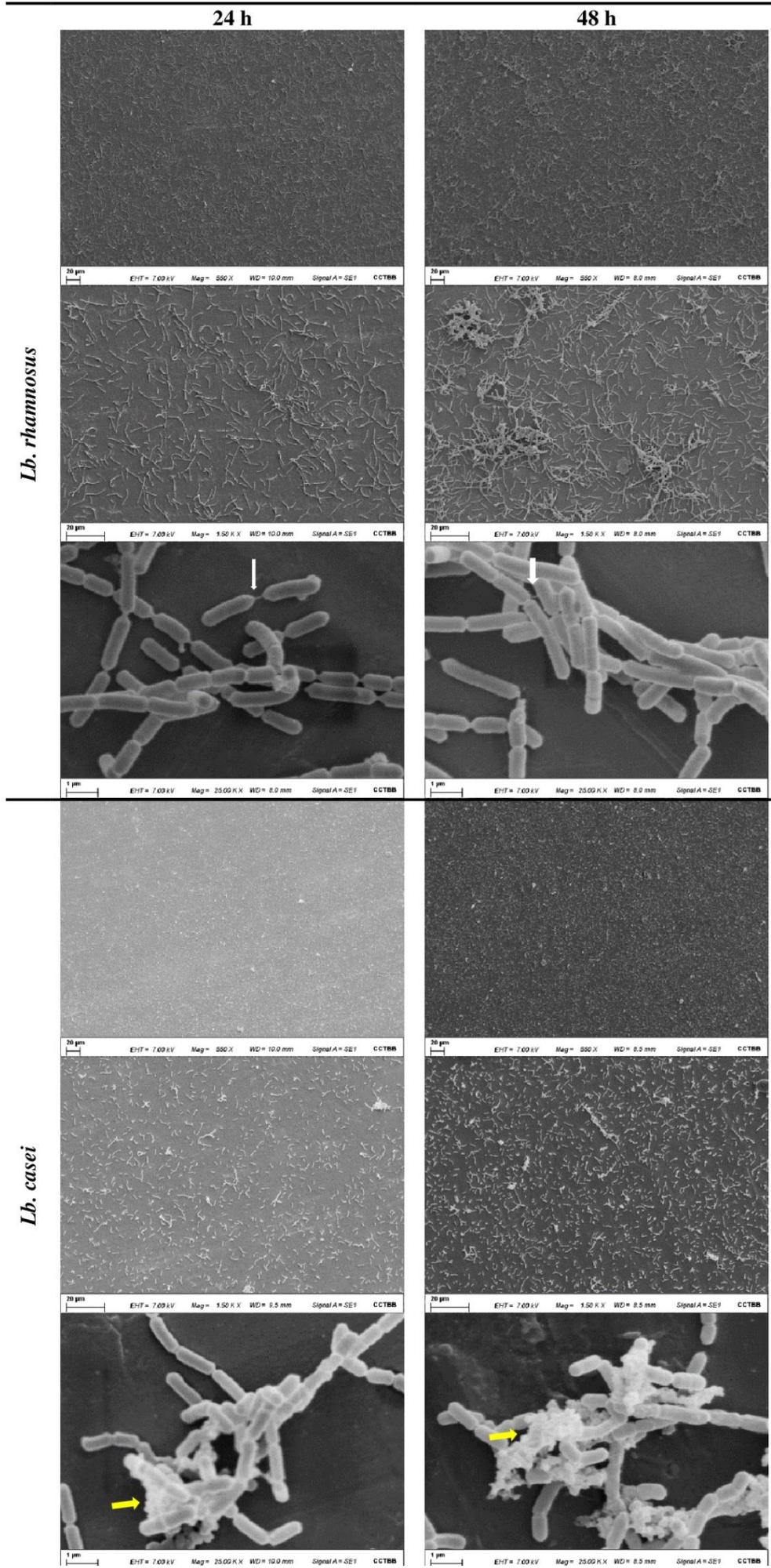
*rhamnosus* ( $p < 0,001$ ) y *Lb. casei* ( $p < 0,01$ ), respectivamente, y no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores de *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* en los tiempos evaluados.

**Tabla 12** Supervivencia (cultivo planctónico) y adhesión sobre acero inoxidable de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei* en jugo de manzana después de 24 y 48 h. Los datos del cultivo planctónico se expresan como log UFC/ml  $\pm$  DE y los de adhesión como log UFC/cm<sup>2</sup> $\pm$ DE.

Tiempo (h)	<i>Lb. rhamnosus</i>		<i>Lb. casei</i>	
	24	48	24	48
<b>Cultivo planctónico</b>	8,48 $\pm$ 0,05	6,42 $\pm$ 0,34 <sup>***</sup>	8,22 $\pm$ 0,39	6,79 $\pm$ 0,26 <sup>**</sup>
<b>Adhesión</b>	6,53 $\pm$ 0,55	6,58 $\pm$ 0,62 <sup>ns</sup>	7,20 $\pm$ 0,07	7,70 $\pm$ 0,09 <sup>ns</sup>

Las diferencias significativas se expresan en referencia al tiempo 24 h.

En el caso de la adhesión al AI, para una misma cepa los valores no variaron significativamente ( $p > 0,05$ ) entre 24 y 48 h. Mientras que al comparar la adhesión tras 48 h, *Lb. casei* se adhiere 1,12 unidades logarítmicas más que *Lb. rhamnosus* ( $p < 0,05$ ). Las fotografías de SEM (**Figura 34**) confirman la adhesión monoespecie de ambas BAL sobre AI y es posible notar la distribución en cadena característica que adoptan las bacterias. Aunque los recuentos en una misma cepa no presentan diferencias significativas entre 24 y 48 h, las imágenes de SEM muestran un aumento en la colonización de la superficie luego de 48 h. En *Lb. rhamnosus* se aprecian fibrillas que favorecen las conexiones célula-célula (**Figura 34**, flechas blancas), mientras que en *Lb. casei* además de agruparse y formar cadenas entre ellas, también se observa la presencia de EPS (**Figura 34**, flechas amarillas). En conjunto, esto representa un claro indicador de la capacidad adhesiva de ambas especies de *Lactobacillus*, por lo cual es posible considerarlas como buenas candidatas para formar biofilms protectores sobre AI empleando jugo de manzana como matriz alimentaria.



**Figura 34** *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei* tras 24 y 48 h de adhesión sobre AI. Las flechas blancas indican las uniones entre células por fibrillas y las amarillas, posibles restos de EPS. Magnificaciones 550 X (primer fila), 1.50 KX (segunda fila) y 25.00 KX (tercer fila).

#### II.4.2 Análisis fisicoquímico

Los datos de la **Tabla 13** recopilan los resultados del efecto que los biofilms de *Lb. casei* y *Lb. rhamnosus* tienen en la matriz alimentaria. Los parámetros probados fueron los que se consideran indicadores de deterioro por este tipo de microorganismos en jugo de manzana: pH, °Brix, AT y turbidez. El pH del jugo se mantuvo en entre 3,30 y 3,65, sin presentar diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre la muestra con BAL y el control, lo mismo ocurrió con los °Brix y AT. Sin embargo, la turbidez del jugo se incrementó tras 168 h ( $p > 0,001$ ) en presencia del biofilms de *Lb. rhamnosus* y tras 24 h ( $p < 0,05$ ) en presencia *Lb. casei*, en los tiempos restantes no se encontraron diferencias significativas en comparación con el control. A excepción de la turbidez en tiempos específicos, los resultados demuestran que características como el pH, °Brix, AT no se modifican significativamente ( $p > 0,05$ ) en presencia de los biofilms de *Lactobacillus*.

**Tabla 13** Propiedades fisicoquímicas del jugo de manzana después de la exposición a biofilms de *Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 a diferentes tiempos.

	Tiempo (h)	Log UFC/cm <sup>2</sup>	pH	°Brix	Turbidez	AT <sup>†</sup>
<b>Control</b>		—	3,59±0,05	10,43±0,60	0,23±0,12	3,22±0,09
	24	7,65±0,70	3,65±0,09	10,20±0,42	2,95±1,52	2,37±0,77
<b><i>Lb. casei</i></b>	120	7,86±0,32	3,45±0,21	10,50±0,71	0,43±0,17	4,27±1,30
	168	7,46±0,79	3,30±0,23	10,01±0,27	0,50±0,18	3,59±0,85
<b><i>Lb. rhamnosus</i></b>	24	8,45±0,06	3,62±0,07	11,00±0,71	0,92±1,22	2,63±1,39
	120	8,83±0,53	3,63±0,12	10,50±0,71	0,24±0,27	3,98±1,35
	168	8,13±0,22	3,53±0,04	10,00±0,41	0,49±0,06	3,02±0,38

AT<sup>†</sup>: Acidez titulable

## II.5 Efecto antagónico de las BAL sobre bacterias patógenas: competencia (co-adhesión) y exclusión (biofilm preformado de BAL).

En los ensayos previos (Capítulo I) hemos evaluado la adhesión de las tres bacterias patógenas alimentarias comenzando con un inóculo elevado ( $10^8$  UFC/ml), es por lo que aquí estudiamos la capacidad de supervivencia y adhesión usando un inóculo menor ( $10^4$  UFC/ml). En los CP controles de las bacterias patógenas, los recuentos fueron los siguientes:  $0,50 \pm 0,71$  log UFC/ml en el caso de *L. monocytogenes*,  $1,24 \pm 0,34$  log UFC/ml para *E. coli* O157:H7 y  $2,39 \pm 0,55$  log UFC/ml para *S. enterica*. En el caso de las adhesiones monoespecie, el mayor valor fue para *S. enterica*, seguido por *L. monocytogenes* y finalmente por *E. coli* O157:H7 tras 24 h de incubación (Tabla 14). Cuando se co inocularon con las BAL en los CP, en todos los casos los recuentos se redujeron significativamente, hasta valores no detectables. Los mismos resultados se observaron en los ensayos de competencia y exclusión. La presencia de *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* redujo significativamente ( $p < 0,001$ ) la adhesión de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 hasta niveles no detectables mediante el método de recuento en placa.

**Tabla 14** Efecto de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 ( $10^8$  UFC/ml) frente a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 ( $10^4$  UFC/ml) en biofilms co-adheridos y preformados sobre acero inoxidable. Los resultados se expresan como log UFC/cm<sup>2</sup>  $\pm$  DE.

Patógeno	Control	<i>Lb. rhamnosus</i>		<i>Lb. casei</i>	
		Co-adhesión	Preformado	Co-adhesión	Preformado
<i>L. monocytogenes</i>	$2,48 \pm 0,74$	ND	ND	ND	ND
<i>S. enterica</i>	$2,81 \pm 0,47$	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> O157:H7	$1,85 \pm 0,21$	ND	ND	ND	ND

ND: no detectado, por debajo del límite de detección.

Al mismo tiempo, se analizó el recuento de las BAL después de exponerse a las bacterias patógenas (Tabla 15). Los resultados revelaron que, en CP, la presencia de las bacterias patógenas afecta a *Lb. rhamnosus*, y *S. enterica* afecta los recuentos de *Lb. casei* ( $p < 0,01$ ). En el caso de la co-adhesión, la presencia de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 modifica

( $p < 0,01$ ) los recuentos de *Lb. rhamnosus*, y únicamente *E. coli* O157:H7 afecta a *Lb. casei* ( $p < 0,001$ ). Por otra parte, en los ensayos de exclusión, la presencia de bacterias patógenas no modificó ( $p > 0,05$ ) los recuentos ni de *Lb. rhamnosus* ni de *Lb. casei* siendo esta la condición más favorable para ambas BAL. Si bien en algunas condiciones (ensayos de CP y competencia) la presencia de bacterias patógenas afecta los recuentos de las BAL, en todos los casos se observó una disminución significativa de los patógenos.

**Tabla 15** Recuento celular de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei* en cultivo planctónico (CP), co-adheridos (CA) y preformado (PF) en presencia de *Escherichia coli*, O157:H7, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*, luego de 24 h de incubación.

(A) Adhesión mono especie de las BAL, control. Los resultados se expresan como log UFC/ml  $\pm$  DE en los CP y como log UFC/cm<sup>2</sup>  $\pm$  DE en las adhesiones.

	Modo de cultivo/adhesión	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. casei</i>
<b>Control</b>	CP	8,48 $\pm$ 0,05	8,22 $\pm$ 0,39
	A	6,53 $\pm$ 0,55	7,20 $\pm$ 0,07
<i>L. monocytogenes</i>	CP	5,36 $\pm$ 0,76 <sup>***</sup>	6,45 $\pm$ 0,87 <sup>ns</sup>
	CA	5,49 $\pm$ 0,04 <sup>**</sup>	7,55 $\pm$ 0,13 <sup>ns</sup>
	PF	6,13 $\pm$ 0,43 <sup>ns</sup>	7,42 $\pm$ 0,09 <sup>ns</sup>
<i>S. enterica</i>	CP	4,68 $\pm$ 0,54 <sup>***</sup>	4,97 $\pm$ 0,95 <sup>**</sup>
	CA	5,76 $\pm$ 0,28 <sup>ns</sup>	6,59 $\pm$ 0,75 <sup>ns</sup>
	PF	5,86 $\pm$ 0,09 <sup>ns</sup>	6,73 $\pm$ 0,10 <sup>ns</sup>
<i>E. coli</i> O157:H7	CP	5,71 $\pm$ 0,65 <sup>**</sup>	6,95 $\pm$ 0,31 <sup>ns</sup>
	CA	5,53 $\pm$ 0,17 <sup>**</sup>	5,95 $\pm$ 0,13 <sup>***</sup>
	PF	6,48 $\pm$ 0,07 <sup>ns</sup>	7,18 $\pm$ 0,09 <sup>ns</sup>

Las diferencias significativas se expresan en referencia al Control de las BAL (CP o A).

## DISCUSION

### II.6 Caracterización de las BAL

En este capítulo se describió el comportamiento de *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* en jugo de manzana, tanto en su forma de vida libre como sésil, y se evaluó su efecto sobre *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7, con el objetivo de encontrar estrategias de biocontrol en un ambiente que imite la producción de jugos de frutas. Inicialmente, se observó que los sobrenadantes correspondientes a los extractos crudos inhiben a las tres bacterias patógenas ensayadas. *E. coli* O157:H7 presentó mayor resistencia en comparación con *S. enterica* y *L. monocytogenes*, y esta última fue quién presentó mayor susceptibilidad. La ausencia del halo de inhibición por parte de los sobrenadantes neutralizados sugiere que el efecto inhibitorio estaría dado por los ácidos orgánicos que producen las BAL (Tomás et al., 2004). Las diferentes sensibilidades entre especies podrían atribuirse a la composición de la pared celular (Helander et al., 1997; Nikaido, 2003). Los resultados son consistentes con aquellos informados por otros autores (Fakhry et al., 2021; Kamal et al., 2018; Roldán et al., 2005; Rodes et al., 2013) quienes han informado que diferentes cepas de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. presentan susceptibilidad al extracto crudo de lactobacilos como *Lb. casei* y *Lb. rhamnosus*. Estos autores atribuyen el efecto a una combinación de sustancias de naturaleza peptídica junto a una acción parcial del peróxido de hidrógeno, a las formas no disociadas del ácido acético, ácido láctico y de la acidez del medio. La actividad antimicrobiana de las BAL se debe principalmente a la reducción del pH por la secreción de ácido láctico como producto final principal, además de metabolitos como nisinas, bacteriocinas, acidofilinas y toxinas, las cuales son activas frente a una amplia gama de bacterias y levaduras (Axelsson, 2004).

Otro punto que se analizó fue la agregación de las especies de BAL. La autoagregación alcanzó valores de aprox. 20 % para *Lb. rhamnosus* y 30 % para *Lb. casei*. Diversos valores de autoagregación han sido reportados para estas cepas. Por ejemplo, Woo & Ahn, (2013) reportaron valores de autoagregación de 29 % para *Lb. rhamnosus* y menores al 20 % en el caso de *Lb. casei*; Collado et al. (2008) informaron una autoagregación de 78 % para *Lb. rhamnosus* GG, y Giordano & Mauriello, (2023) de 24 % para *Lb. casei* 393.

Si bien la autoagregación es un factor importante, ya que puede incrementar la concentración excretada de sustancias inhibitorias (Kaewnopparat et al., 2013), la coagregación con las bacterias patógenas es relevante, debido a la potencial aplicación de las BAL en las plantas procesadoras de alimentos (Gómez et al., 2016). En este trabajo, *L. monocytogenes* y *S.*

*enterica* presentaron los mayores porcentajes de coagregación con *Lb. rhamnosus*, mientras que *E. coli* O157:H7 presentó el mayor porcentaje con *Lb. casei*. Con relación a ello, Merino, (2019) concluyó que la capacidad de coagregación entre los lactobacilos y *Salmonella* resultó ser dependiente de la cepa, similares conclusiones fueron reportadas por Gómez et al. (2016) con *Lb. curvatus*, *Lb. casei*, *Lb. lactis* en presencia de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*. Los resultados de esta primera parte sustentan la idea que tanto el efecto inhibitorio de los sobrenadantes libres de células observado como la coagregación pueden evitar que las células patógenas se adhieran y formen biofilms en superficies abióticas como el AI (Lang et al., 2010; Twetman et al., 2009; Woo & Ahn, 2013).

Para una futura aplicación en la industria productora de jugo de manzana, las BAL deben ser capaces de sobrevivir a las características propias que impone el jugo de manzana y, además, adherirse a la superficie de uso alimentario como el AI. Los hallazgos de este estudio (**Tabla 12**) demostraron que *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* se mantienen viables después de 48 h (aprox. 6,50 log UFC/ml) en jugo de manzana a 25 °C. Se ha sugerido que el bajo pH de esta matriz alimentaria (aprox. 4,3) podría favorecer la supervivencia de las cepas de *Lactobacillus*, quienes son capaces de resistir y sobrevivir en un rango de pH de 3,7-4,3 (Patel, 2017; Tripathi & Giri, 2014). Debido a su tolerancia en ambientes ácidos, ciertas especies, como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, pueden crecer en varias matrices de frutas, como el jugo de naranja, piñas, uva, pera y mango (Nagpal et al., 2012; Pakbin et al., 2014; Peres et al., 2012; Sheehan et al., 2007). Por ejemplo, *Lb. rhamnosus* GG fue capaz de sobrevivir en jugos de naranja y de piña (pH 3,65 y 3,40, respectivamente) durante 12 semanas; sin embargo, el ambiente ácido generó una pérdida de viabilidad. De la revisión bibliográfica y de los resultados de este capítulo, se puede inferir que la viabilidad de las BAL está influenciada por la matriz alimentaria (Shori, 2016), condiciones externas (temperatura, pH) y de las cepas en sí (Champagne & Gardner, 2008).

Estudios previos han señalado la importancia de las matrices alimentarias tanto en la viabilidad, como en la formación de biofilm y, por ende, la eficacia de los tratamientos de biocontrol (Ganegama Arachchi et al., 2013; Perricone et al., 2014). En este estudio, posterior a observar que ambas BAL sobreviven a la matriz alimentaria, se halló que *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* se adhieren y colonizan la superficie de AI. Los valores de adhesión encontrados fueron superiores a 6,5 log UFC/cm<sup>2</sup> (**Tabla 12**); por su parte, las imágenes de SEM (**Figura 34**) demuestran la colonización y la distribución de estas sobre la superficie de AI. Esto representa un claro indicador de la buena capacidad adhesiva de ambas especies de *Lactobacillus* y, por tanto, nos permite inferir que serían buenas candidatas para formar biofilms protectores sobre

AI en entornos de producción de jugos. En resumen, los hallazgos aquí obtenidos apoyan lo hipotetizado por Falagas & Makris, (2009), quienes proponen utilizar microorganismos no patógenos como parte de los productos de limpieza diaria para reducir la incidencia de microorganismos patógenos.

Las BAL han despertado mucho interés como agentes de biocontrol en superficies, envases y como bioconservantes en los propios alimentos (Maillet et al., 2021; Martínez et al., 2015). Aunque el objetivo principal de este capítulo fue evaluar el efecto de las BAL sobre las bacterias patógenas, se investigó el efecto que tenían sobre la matriz alimentaria, debido a que son datos de importantes al pensar en su posible aplicación en la industria alimentaria. Según los resultados obtenidos sobre el análisis fisicoquímico (**Tabla 13**), las BAL no modifican el pH, la AT, y los °Brix del jugo de manzana; solo se incrementó la turbidez tras 24 h en *Lb. casei*, aunque este cambio podría ser no significativo.

### **II.7 Efecto de *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* sobre las bacterias patógenas**

Toushik et al. (2021) han identificado propiedades antibiofilm prometedoras de dos BAL (*Leuconostoc mesenteroides* y *Lb. plantarum*) para controlar patógenos transmitidos por alimentos de origen marino. El presente estudio se centró en evaluar una posible estrategia de biocontrol con el uso de BAL sobre un sector desatendido como es el de las industrias de procesado de jugos. Los resultados corroboraron la capacidad de los biofilms de *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* para restringir la adhesión y la proliferación (hasta valores no detectables) de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 sobre AI empleando jugo de manzana como matriz alimentaria. En este caso, y también en CP, no se observaron diferencias significativas en las estrategias de biocontrol (exclusión y competencia) evaluadas. Kamal et al. (2018) detectaron que los patrones de inhibición de las BAL parecen depender de la concentración inicial de las bacterias patógenas; cuanto menor es el número de patógenos, más pronunciado es el efecto inhibitorio hasta alcanzar la eliminación completa. Esto también podría ser un factor adicional que explique el efecto de las BAL sobre las bacterias patógenas.

Diferentes especies de BAL como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., pueden reducir la adhesión, la colonización y la formación de biofilms de patógenos a través de la competencia por los sitios de unión al sustrato y los nutrientes disponibles, así como también por la producción de metabolitos como ácidos orgánicos, biosurfactantes y por mecanismos como la coagregación (Collado et al., 2007; García-Cayuela et al., 2014; Tahmourespour & Kermanshahi, 2011). Los resultados alcanzados en cuanto a la inhibición de bacterias patógenas por parte de las BAL concuerdan con otros autores, quienes reportaron el efecto

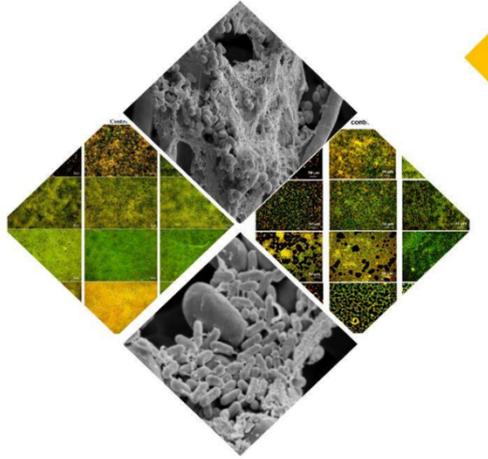
inhibitorio de las BAL contra *L. monocytogenes* utilizando un biofilm preformado para inhibir el crecimiento del patógeno (Guerrieri et al., 2009; Mariani et al., 2011; Pérez-Ibarreche et al., 2016; Speranza et al., 2009). Guerrieri et al. (2009) comprobaron que los biofilms formados por BAL, productoras (*Lb. plantarum* 35d, *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1) y no productoras (*Lb. plantarum* 396/1, *Enterococcus faecalis* JH2-2) de bacteriocinas, reducían la supervivencia y la multiplicación de *L. monocytogenes*. Por su parte, Pérez-Ibarreche et al. (2016) indicaron que un biofilm preformado de *Lb. sakei* CRL1862 sobre AI y politetrafluoroetileno reduce la adhesión de un aislamiento clínico de *L. monocytogenes* (FBUNT), y Gómez et al. (2016) encontraron que diferentes BAL, mediante la exclusión, reducen efectivamente a *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7. Woo & Ahn, (2013) demostraron que a través de mecanismos de competencia, exclusión y desplazamiento *Lb. acidophilus* KACC 12419, *Lb. paracasei* KACC 12427, *Lb. casei* KACC 12413 y *Lb. rhamnosus* KACC 11953 reducen la formación de biofilms no solo de *L. monocytogenes* sino también de *S. enterica*. Haraguchi et al. (2019) utilizó *Lb. lactis subsp. lactis* BF1 y *Lb. plantarum* Tennozu-SU2 como fermento de la leche de soja en presencia de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* (6–7 log UFC/ml) y reportaron reducciones de la viabilidad de los patógenos de 2–4 log UFC/ml después de 7 días de almacenamiento a 10 °C. Los mismos autores proponen que los mecanismos de los *Lactobacillus* para inhibir a los patógenos podrían ser la disminución del pH y los metabolitos secretados por las BAL.

Por otro lado, al analizar los recuentos de las BAL después de ser expuestas a la presencia de bacterias patógenas, se notó una disminución de los recuentos de ambos *Lactobacillus* tanto en CP como en los ensayos de competencia (**Tabla 15**). Sin embargo, esto no impidió que las BAL sean capaces de disminuir la viabilidad de las tres bacterias patógenas. En relación con ello, se ha reportado que, la disminución de la viabilidad celular de *Lb. casei* (206/1) no imposibilita que las sustancias antimicrobianas que libera al medio sean suficientes para ejercer su acción bactericida sobre *E. coli* O157:H7, razón por la cual a las 24 h de incubación ya no detectaban la presencia del patógeno (Roldán et al., 2005). A pesar de que se registró una disminución en la viabilidad de las BAL en los CP y en los ensayos de competencia, no ocurrió lo mismo con la exclusión, lo cual podría significar una ventaja para ellas frente a la presencia de bacterias patógenas.

La presente tesis permitió profundizar en el estudio de las BAL como agentes de biocontrol frente a patógenos de origen alimentario y su aplicación como alternativa "ecoamigable" en las instalaciones de procesamiento de jugos, demostrando una alternativa de control del crecimiento y adhesión de patógenos.

Parte de los resultados obtenidos en este capítulo conforman el manuscrito:

"Biological control of foodborne pathogens by lactic acid bacteria: a focus on juice processing industries". Tarifa M.C., **Agustín, M.R.**, Brugnoli, L.I. (2023) Revista Argentina de Microbiología. Aceptado. (Ref. RAM-D-22-00077).



# CAPITULO III

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS  
VOLÁTILES Y ESTRATEGIAS DE REMOCIÓN Y/O  
PREVENCIÓN DE BIOFILMS

## CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES Y ESTRATEGIAS DE REMOCIÓN Y/O PREVENCIÓN DE BIOFILMS

### HIPÓTESIS

- *C. tropicalis* produce compuestos orgánicos volátiles (COV) y algunos de ellos participan en la regulación de la formación de biofilms.
- La utilización de FAR en combinación con antifúngicos como NAT previene y/o remueve la formación de biofilms de levaduras involucradas en el deterioro de jugos de fruta, lo cual limita la asociación con bacterias patógenas alimentarias, y, por consiguiente, previene la adhesión y permanencia en los biofilms.

### OBJETIVOS

- Identificar y cuantificar los COV en biofilms de levaduras asociadas al deterioro en la producción de jugo de manzana, en presencia y ausencia de bacterias patógenas alimentarias.
- Analizar el efecto de TIR, 2-FE y FAR sobre biofilms de levaduras.
- Evaluar la efectividad del FAR en combinación con NAT en biofilms multiespecie formados sobre acero inoxidable y membranas de ultrafiltración.

## INTRODUCCIÓN

Las levaduras tienen la capacidad de crecer en diversos microhábitats e interactuar con otros microorganismos. Por consiguiente, han desarrollado mecanismos naturales para relacionarse con otras especies, produciendo metabolitos secundarios, enzimas y diversos compuestos. Ciertos metabolitos participan regulando (estimulando o inhibiendo) la formación de biofilms; en cuanto a la inhibición, pueden ejercer un efecto bactericida directo sobre los microorganismos, mientras que otros muestran actividades indirectas de inhibición de biofilms, relacionadas principalmente con la inhibición de los sistemas QS (Coughlan et al., 2016). Dentro de las MQS que permiten la comunicación celular en biofilms se pueden mencionar los compuestos orgánicos volátiles (COV). Las bacterias y las levaduras producen una amplia gama de COV, que se secretan como metabolitos primarios durante el crecimiento, como metabolitos secundarios para protegerse contra antagonistas, o como moléculas de señalización celular (Padder et al., 2018; Schulz & Dickschat, 2007). Los COV se caracterizan por ser moléculas pequeñas (<C15), con una baja masa molecular (por lo general < 300 Da), solubles debido a su polaridad, se convierten fácilmente en vapor o gas y a 20 °C tienen una presión de vapor igual o mayor a 0,01 kPa. En general, sus puntos de ebullición oscilan entre 50 y 260 °C (Guenther, 1995; Schulz-Bohm et al., 2017). Aproximadamente 250 COV han sido caracterizados en diferentes especies de levaduras, los cuales se presentan como una mezcla de hidrocarburos simples, alcoholes, tioalcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, tioésteres y sus derivados, incluidos, entre otros, derivados del benceno y ciclohexanos (Mehmood et al., 2019; Morath et al., 2012). El perfil de COV (llamado volatiloma) de una cepa determinada será variable en función del sustrato, la duración de la incubación, el tipo de nutrientes, la temperatura y otros parámetros ambientales como la presencia de patógenos y el nicho ecológico en el cual se encuentre (Jeleń, 2002; Morath et al., 2012; Parafati et al., 2017). El perfil volátil es una herramienta que permite descubrir nuevos metabolitos, así como tener un acceso rápido a los cambios en el metabolismo de los organismos vivos (levaduras, bacterias), o caracterizar el estado metabólico de la célula, entre otros. Conocer los metabolitos liberados por las levaduras, que además de ser COV, pueden ser considerados como MQS, podría favorecer el desarrollo de nuevas estrategias de remoción o prevención de los biofilms formados por las mismas, a través del bloqueo de estas MQS o empleándolas de forma externa (Bai & Rai, 2011).

Desde el punto de vista de la industria alimentaria, una de las consecuencias más preocupantes de los biofilms multiespecie es que exhiben una mayor resistencia a los procesos diarios de

limpieza y desinfección (Yuan et al., 2020). Por esta razón, los investigadores se han concentrado en esclarecer la complejidad de los biofilms multiespecie y desarrollar nuevas estrategias anti biofilms que sean más efectivas, económicas y sostenibles que las tradicionalmente empleadas (Santos et al., 2018). Uno de los enfoques prometedores para el desafío que plantean los biofilms es el uso de MQS, las cuales inducen adaptaciones fenotípicas que incluyen cambios morfológicos, secreción de factores virulencia y formación de biofilms, inhibiendo o estimulando estos procesos (Deveau & Hogan, 2011; Kruppa, 2009; Rodrigues et al., 2020; Yapıcı et al., 2021). Dentro de estas MQS secretadas en respuesta a la densidad celular en el biofilm, se encuentran FAR y sus análogos derivados, los cuales exhiben propiedades anti biofilms, antitumoral y fungicida (Rodrigues et al., 2020). Se ha demostrado que FAR presenta efectos inhibitorios significativos sobre la patogenicidad de especies de levaduras consideradas resistentes (Dižová & Bujdánková, 2017); por ejemplo, a determinadas concentraciones (300  $\mu$ M), FAR inhibe la formación de biopelículas formadas por *C. albicans* (Xia et al., 2017). Aunque FAR actúa sobre los cambios morfológicos en *Candida* spp., estudios previos han demostrado que también presenta actividad antibacteriana contra bacterias patógenas grampositivas como *Staphylococcus* spp. (Buchbauer & Ilic, 2013; Lopes et al., 2021) y *Enterococcus faecalis*, además FAR mejora la susceptibilidad a los antibióticos de *S. aureus* (Jabra-Rizk et al., 2006), *Paracoccidioides brasiliensis* (Derengowski et al., 2009) y *Streptococcus mutans* (Koo et al., 2002). Se ha descrito que el mecanismo antimicrobiano de FAR se basa en la capacidad de inducir un desequilibrio iónico dependiente de la dosis en la membrana celular bacteriana, provocando así una interrupción en la pared celular, daño en las membranas citoplasmáticas e interferencia en la funcionalidad celular (Cetin-Karaca, 2011; Inoue et al., 2004). La ruptura de la membrana celular conduce a la fuga del contenido interno de la célula y provoca la muerte celular (Calo et al., 2015).

Con el objetivo de interrumpir la formación de biofilms de levaduras y debido a los efectos antimicrobianos reportados de FAR, los investigadores están evaluando esta molécula en combinación con diferentes antimicrobianos o antifúngicos (Wongsuk et al., 2016). FAR se ha combinado con compuestos como fluconazol, 5-flucitosina, anfotericina B, caspofungina (Bozó et al., 2016; Katragkou et al., 2015; Kovács et al., 2016; Monteiro et al., 2017) específicamente contra biofilms de *C. albicans*, especie relevante en el entorno clínico. Hasta el momento, no se han realizado investigaciones sobre la efectividad de tratamientos combinados contra biofilms de levaduras relacionadas con el procesamiento de alimentos; menos aún sobre biofilms multiespecie, formados por levaduras asociadas a bacterias patógenas alimentarias. En consecuencia, en este capítulo se trabajará con el compuesto FAR,

el cual ha sido identificado junto a TIR y 2-FE en este trabajo como metabolito de los biofilms de *C. tropicalis*, combinado con un antifúngico que se emplea en la industria alimentaria, NAT. Si bien no existe el antifúngico ideal para remover o inhibir la formación de los biofilms en un ambiente de procesado de alimentos, NAT se ha convertido en un interesante biopreservante en diferentes alimentos debido a su naturaleza y a su amplio espectro de acción (sección 5.2, Introducción general), lo que lo convierte en una gran oportunidad para progresar en el campo de la seguridad alimentaria, bien utilizándolo solo o en combinación con otros inhibidores. Investigaciones previas han indicado que NAT inhibe el crecimiento de *Saccharomyces* en queso de suero de leche (Gallo & Jagus, 2007; Ollé Resa et al., 2014) y diversas levaduras asociadas a las aceitunas negras (Hondrodimou et al., 2011). En otro estudio se ha comprobado que, en combinación con nisina, NAT es capaz de inhibir el crecimiento de cultivos de *L. plantarum* y *Zygosaccharomyces bailii* en jugos con sabor a limón (Garavaglia et al., 2019). Emplear FAR, solo o en combinación con NAT, puede ofrecer una gran oportunidad para avanzar en el campo de la seguridad alimentaria. La literatura científica presente hasta el momento no da evidencia del efecto combinado de NAT con una MQS como FAR, frente a biofilms formados por levaduras aisladas de la industria productora de jugo de manzana asociadas a bacterias patógenas alimentarias.

Atendiendo a la relevancia de lo descrito, se establecieron dos objetivos principales en este capítulo; en el primero, se procedió a identificar y cuantificar los principales metabolitos liberados (COV) en biofilms mono y multiespecie formados sobre AI y MUF en jugo de manzana. La identificación de COV se efectuó en biofilms de *C. tropicalis*, y la cuantificación se llevó a cabo en biofilms de *C. tropicalis* y *C. krusei* en presencia de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7. El segundo objetivo consistió en evaluar los efectos de FAR, TIR y 2-FE, identificadas previamente como COV de los biofilms de *C. tropicalis*, sobre los biofilms monoespecie de *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefir* y su mezcla. Cabe señalar que, FAR, TIR y 2-FE se han identificado como MQS previamente y han demostrado actividad inhibitoria sobre especies de *Candida*. En una segunda instancia, dado que FAR presentó efectos inhibitorios sobre los biofilms de las levaduras, se lo seleccionó para evaluar su efecto en combinación con NAT. Teniendo en cuenta los resultados del Capítulo I, donde se observó una fuerte asociación entre levaduras y bacterias sobre AI y MUF, el efecto de NAT+FAR se evaluó sobre biofilms de levaduras y también sobre biofilms multiespecie (mezcla de levaduras + *L. monocytogenes* o *S. enterica* o *E. coli* O157:H7).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se evaluaron diferentes combinaciones de microorganismos (biofilms mono, duales y/o multiespecie), superficies (AI y MUF), muestras (cultivos planctónicos, adheridas, sobrenadantes de los biofilms) y métodos de extracción (extracción con solventes y HS/SPME). Las suspensiones de levaduras se prepararon como se describe en la sección 9.1 y las suspensiones bacterianas como se describe en la sección 9.2. *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7 se pre adaptaron al jugo de manzana previo al ajuste de la suspensión ( $10^8$  UFC/ml).

Es importante precisar que, en un principio, nos centramos en caracterizar los metabolitos y analizar los efectos de los compuestos (TIR, 2-FE, FAR, NAT) sobre biofilms de *C. tropicalis*. Como se ha confirmado, es una de las especies más representativas en las líneas de producción de alimentos, y, junto con *C. krusei*, se han aislado en repetidas ocasiones de las superficies de los equipos de producción de alimentos (Brugnoni et al., 2007; Tarifa et al., 2013). Otra característica que hace relevante el estudio de *C. tropicalis*, es la formación de pseudohifas, ya que estas favorecen el desarrollo de la estructura tridimensional de los biofilms formados por la microbiota residente.

En las secciones siguientes se presentarán los detalles de las metodologías y las combinaciones de microorganismos utilizadas para identificar y cuantificar los COV de los biofilms, así como aquellas empleadas para evaluar las estrategias de remoción y/o prevención de biofilms.

### III.1 Identificación y cuantificación de COV: GC/MS

Existen diferentes métodos de análisis que permiten identificar y determinar la concentración de metabolitos orgánicos en muestras acuosas (Fernandez-Alba et al., 1998; Jones-Lepp et al., 2000). Debido a la complejidad de la matriz a ser analizada, los métodos se basan en técnicas de separación (como la cromatografía) y como los compuestos a detectar se encuentran presentes en bajas concentraciones, se precisan sistemas de detección que sean sensibles o bien una etapa de preconcentración de la muestra previa a la separación y detección (Kataoka et al., 2000). Dentro de los diversos métodos elaborados para el estudio de matrices complejas como los alimentos, se puede mencionar la cromatografía de gases (GC, del inglés *gas chromatography*), la cromatografía líquida de alta resolución o la espectrometría de masas (del inglés *mass spectrometry*, MS) (Augusto et al., 2010). El GC acoplado a MS (GC/MS) es una técnica de análisis adecuada para el estudio de COV biológicos, debido a su elevada capacidad

de separación, a los tiempos de retención reproducibles y a la detección selectiva, sensible y versátil de masas (Tait et al., 2014). La gestión de temperaturas de trabajo en un rango similar (50 – 350 °C), la fase de trabajo gaseosa, las bajas concentraciones y su rango (ppt - ppm) son características compartidas por GC/MS. Adicionalmente, la MS es una de técnica que permite identificar los compuestos al mismo tiempo que los cuantifica (Richardson, 2002).

Para caracterizar los metabolitos liberados en biofilms, en este estudio, se utilizó un cromatógrafo GC 7890B, equipado con un espectrómetro de masa, serie 5977A (Agilent Technologies). Las muestras se inyectaron en una columna capilar HP-5 Ms (longitud: 30 m, diámetro interno: 0,25 mm, espesor de la película: 0,25  $\mu\text{m}$ ), y se ionizaron mediante una energía eléctrica de 70 eV. Se usó helio como gas portador con un caudal de 1-1,5 ml/min. La identificación de metabolitos y los tiempos de retención se realizaron mediante la comparación de los patrones de fragmentación de la biblioteca GC-MS 2.0 del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST). El modo de exploración que se empleó fue SCAN, lo que permitió detectar un rango de masas de 50 a 550 m/z.

### III.2 Técnicas de preconcentración de las muestras

Como se aclaró previamente, para determinar los COV en una matriz compleja como lo es el jugo de manzana es necesario utilizar técnicas de preconcentración como etapa previa para la determinación e identificación de estos compuestos. Con el fin de lograr un método práctico y confiable para el análisis de matrices complejas, se han desarrollado varios métodos de preparación de muestras que incluyen destilación al vapor, extracción con solventes orgánicos, surfactantes y fluidos supercríticos, y extracción en fase sólida. Las técnicas de extracción se pueden clasificar en dos grandes familias en función de la naturaleza de la fase extractante: extracción líquido-líquido (ELL) y extracción en fase sólida (Castillo et al., 1997).

Una de las técnicas más tradicionales utilizadas para analizar los COV presentes en los alimentos y bebidas es la ELL con solvente (Plutowska & Wardencki, 2007). Esta técnica se basa en la partición de los compuestos volátiles entre dos líquidos inmiscibles, generalmente agua y un disolvente orgánico. La ELL se basa en el empleo de ampollas de decantación en los cuales tiene lugar el intercambio de analito(s) entre las fases inmiscibles mediante etapas sucesivas de agitación, reposo y separación de fases. La selección del disolvente que compondrá la fase extractante en los procesos de extracción líquido-líquido es crucial, puesto que determinará, *a priori*, la selectividad y eficiencia del proceso. Se suelen emplear como disolventes orgánicos de extracción, aquellos con baja polaridad como el diclorometano, el éter di etílico, el acetato de etilo, el hexano o el tolueno. Entre las desventajas de este tipo de técnica

se encuentra que suele ser tediosa debido al tiempo prolongado de preparación de muestras, una mayor cantidad de muestra y un procedimiento de varios pasos, lo que lo hace propenso a la pérdida de metabolitos altamente volátiles (Filippou et al., 2017). Al mismo tiempo, el uso de una gran cantidad de disolvente influye en el análisis de trazas e impone contaminación medioambiental, riesgos para la salud del personal de laboratorio y costos operativos adicionales para el tratamiento de residuos (Kataoka et al., 2000).

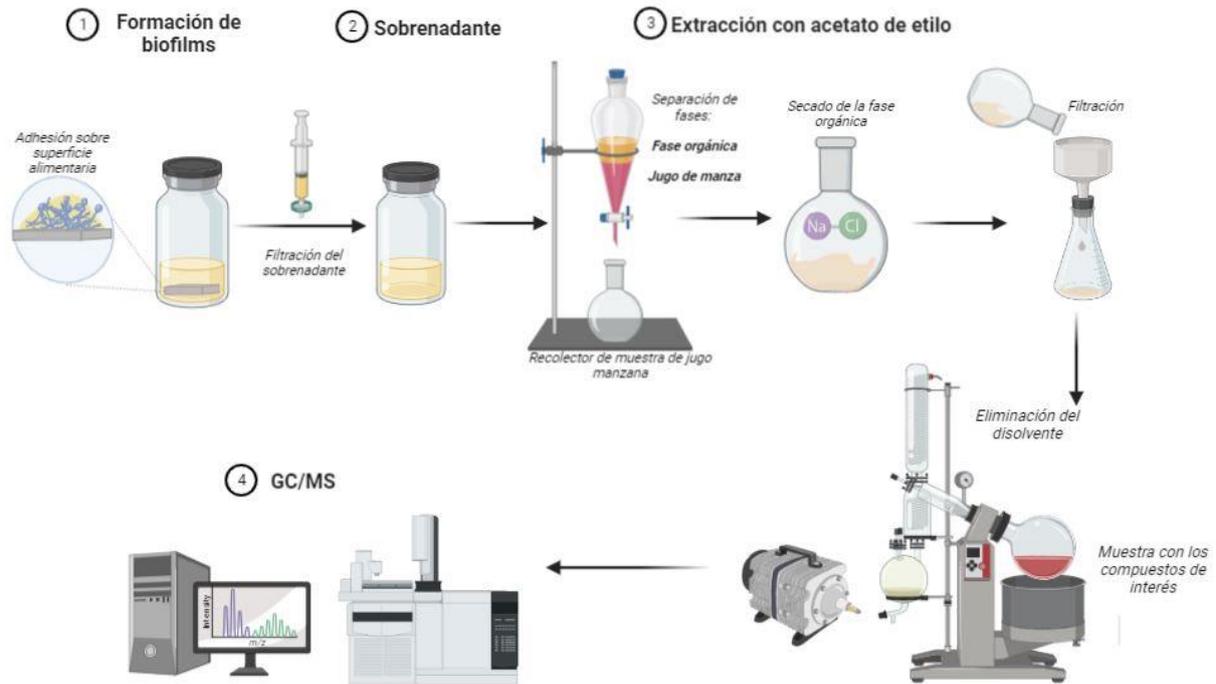
Por otro lado, debido a la combinación de muestreo, extracción, preconcentración e introducción de muestras en un instrumento analítico en un solo paso, la micro extracción en fase sólida (SPME, del inglés *Solid Phase Microextraction*) ha ganado popularidad en muchos campos de aplicación con el correr de los años (Merkle et al., 2015). Esta es una técnica propuesta a principios de los 90 por Arthur & Pawliszyn (1990) que posteriormente se comercializó por SUPELCO (Bellefonte, EE. UU.). El proceso de SPME se basa en la utilización de una fibra cilíndrica de sílice fundida (1 cm de longitud y 0,1 mm de diámetro interno) recubierta con una fase de naturaleza polimérica y es afectado por una serie de variables experimentales que pueden modificarse para incrementar la eficacia del proceso de extracción (Arthur & Pawliszyn, 1990). La extracción tiene lugar al introducir la aguja del dispositivo de SPME en un vial sellado con la muestra, y luego se puede introducir la fibra directamente en la muestra o puede quedar expuesta en el *espacio de cabeza* (del inglés *head space*, HS). En la SPME se establece un equilibrio entre la concentración de analito en la muestra (fase donadora) y el polímero extractante (fase aceptora). Posteriormente, se induce la desorción térmica o elución mediante un disolvente orgánico de los analitos, previa a la determinación analítica (Pawliszyn, 1999). El método ahorra tiempo de preparación, compra de solventes y costos de eliminación, y puede mejorar los límites de detección (Eisert & Levsen, 1996a; Zhang et al., 1994). Se ha utilizado habitualmente en combinación con GC/MS, y se ha aplicado con éxito a una amplia variedad de compuestos, especialmente para la extracción de COV y semivolátiles de muestras ambientales, biológicas y alimentarias, las cuales son matrices complejas con componentes no volátiles o de alto PM como los ácidos húmicos o proteínas (Eisert & Levsen, 1996b; Pawliszyn, 1999; Zhang et al., 1994). Además, permite añadir determinados reactivos para modificar ciertos parámetros de la muestra (pH, fuerza iónica) sin dañar la fibra (Merkle et al., 2015).

En base a lo expuesto, en este trabajo las muestras se pre concentraron con la técnica de extracción por solventes con acetato de etilo y HS/SPME, acoplado a GC/MS.

### III.2.1 Técnica de extracción por solventes

En la **Figura 35** se esquematizan los principales pasos para la extracción de los COV empleados en este estudio. La técnica de extracción por solventes se empleó para analizar los sobrenadantes de los biofilms de *C. tropicalis*. En este experimento, se utilizaron 25 ml de suspensión de *C. tropicalis* para la formación de biofilms, y la adhesión se llevó a cabo en discos de AI de 50 mm de diámetro y 0,5 mm de grosor, que se colocaron en vasos de precipitados. La suspensión de levadura se depositó inicialmente sobre la superficie de AI durante 24 h a 25 °C, y luego se sustituyó por jugo de manzana para proporcionar nutrientes frescos. Cabe señalar, que el volumen de suspensión fue mayor debido a la cantidad de sobrenadante (en este ensayo 15 ml) que se requiere para ser analizada por la técnica. Con el objetivo de establecer qué compuestos se generan y cómo varían en el transcurso del tiempo, las muestras se recolectaron después de 2, 7, 14, 21 y 28 días de incubación. Luego, los sobrenadantes se centrifugaron durante 5 min y se filtraron con una membrana estéril (tamaño de poro de 0,22 µm). Para obtener los extractos se utilizaron iguales cantidades del sobrenadante y de disolvente. Como disolvente se seleccionó acetato de etilo, debido a que el jugo de manzana está diluido en agua. Una vez obtenidos los extractos, estos se concentraron a 45 °C y se almacenaron a 20 °C hasta su uso.

Antes de analizar la muestra mediante GC/MS, se ajustó el volumen final de cada extracto a 1 ml con acetato de etilo y se extrajo 1 µl de la muestra. La temperatura del GC/MS se programó de la siguiente manera: de 50 a 250 °C a razón de 5 °C/min, luego se aumentó a 280 °C a una velocidad de 120 °C/min y se mantuvo a la temperatura final durante 5 min. El inyector y el detector trabajaron a 250 °C y el gas portador fue helio (velocidad de flujo de 1 ml/min). La temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C, la del MSD fue de 250 °C y la del cuadrupolo de 150 °C.



**Figura 35** Representación esquemática de los principales pasos para la extracción de los compuestos orgánicos volátiles con acetato de etilo.

### III.2.2 Técnica de HS/SPME

La selección del tipo de fibra es muy importante para definir las condiciones óptimas de la extracción mediante HS/SPME. En esta tesis se empleó una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (**Figura 36**). Se recomienda este revestimiento para identificar compuestos volátiles y semivolátiles con un número de átomos de carbono entre 3 y 20 con un PM en el rango de 40-275 (Grondin et al., 2015). La fibra de DVB/CAR/PDMS presenta las siguientes características: 50/30  $\mu\text{m}$  con  $L = 1$  cm recubrimiento adherido a un núcleo de sílice fundido flexible, con una aguja tamaño de 24 G (Supelco, Aldrich, Bellefonte, PA, código 57328-U).

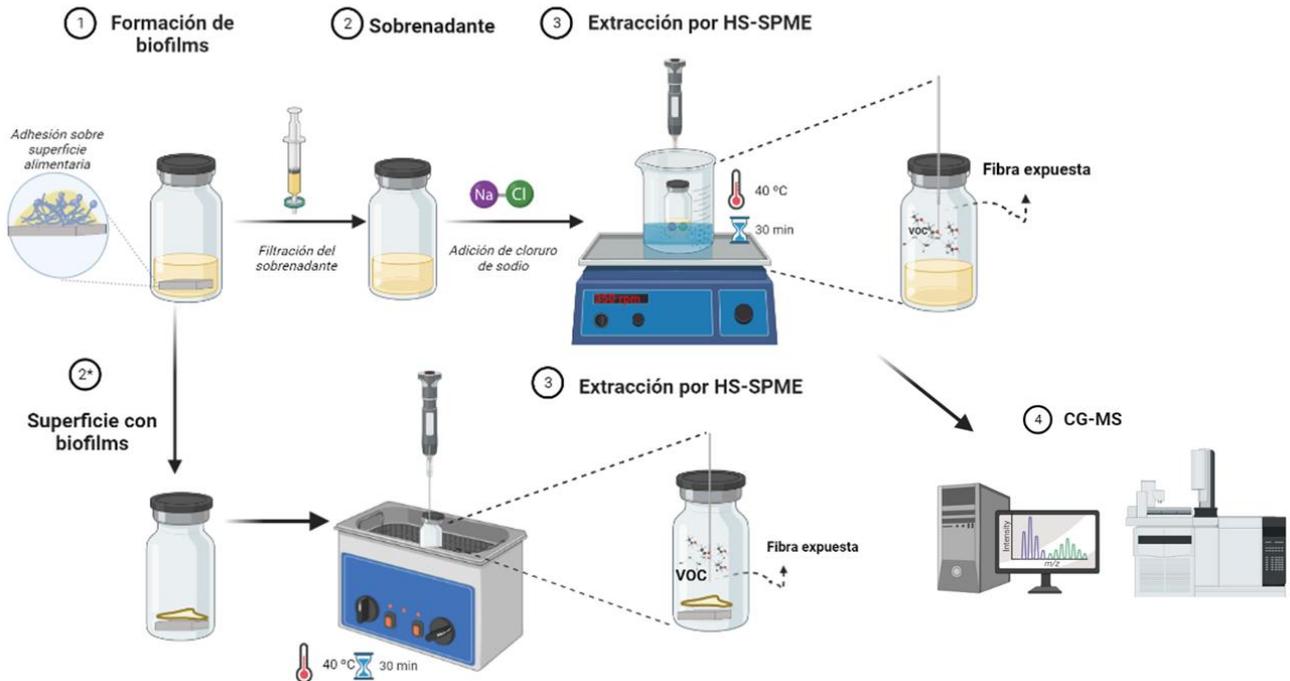
Como se esquematiza en la **Figura 37**, la técnica de HS/SPME se utilizó para analizar tanto los COV de los sobrenadantes de los biofilms como aquellos que se producen directamente en el biofilm (**Figura 37**, señalado como 2\*). En un inicio, se identificaron los COV de los sobrenadantes de los biofilms de *C. tropicalis* y se compararon con los obtenidos mediante la técnica de extracción con solventes. Los biofilms sobre AI se formaron tal cual lo descrito en la sección III.2.1. En este caso, el volumen de sobrenadante fue de 16 ml, y este se colocó en un vial de vidrio de 30 ml que contenía 3,2 g de NaCl. El vial se selló y se introdujo en un baño termostático con agitación a 250 rev/min, a 40 °C por 30 min. Los sistemas de agitación sirven

para reducir el efecto que causa la zona estática que se forma en torno a la fibra y que disminuye la velocidad de extracción, así como para contrarrestar los bajos coeficientes de difusión de las matrices líquidas. Al elaborar un método analítico basado en HS/SPME, debe determinarse el tiempo requerido para alcanzar el estado de equilibrio que es típico de cada analito-fibra, e intentar trabajar bajo esas condiciones. Por consiguiente, la fibra SPME se insertó manualmente en la muestra del vial y se dejó expuesta durante 30 min en el baño termostático. Luego de transcurrido este tiempo, se retiró la fibra y se procedió con la etapa de desorción/elución e inyección de los analitos.



**Figura 36** Soporte de fibra y la fibra de DVB/CAR/PDMS empleada para el método de HS/SPME.

Una de las formas más comunes de realizar la desorción de los analitos es térmicamente en el inyector de un GC, de tal manera que, al incrementar la temperatura, la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas portador. En esta etapa, se introdujo en el puerto de inyección del GC a 250 °C y se mantuvo durante 20 min para desorción térmica de alcoholes. En el GC/MS, la temperatura se programó de 35 a 150 °C a 2 °C/min, se elevó nuevamente a 220 °C a 10 °C/min y la temperatura final se mantuvo 15 min.



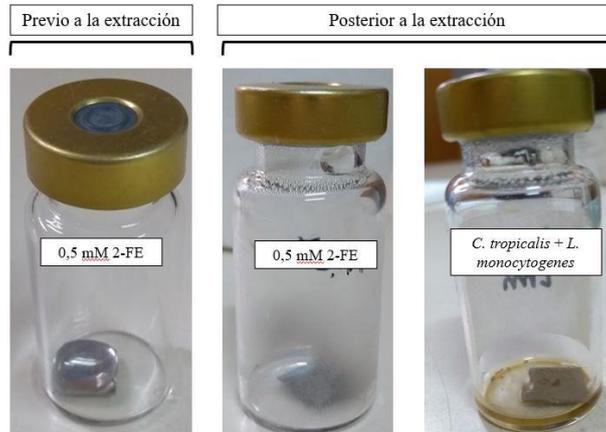
**Figura 37** Representación de la extracción de compuestos orgánicos volátiles de biofilms por la técnica de HS/SPME acoplado a GC/MS.

### III.3 Cuantificación de 2-feniletanol en biofilms de *C. tropicalis* y *L. monocytogenes*

En esta sección, se cuantificó la producción de 2-FE en biofilms monoespecie de *C. tropicalis* y en duales formados en presencia de *L. monocytogenes*. Se seleccionó 2-FE debido a que, en los resultados anteriores de identificación de COV (III.2.1 y III.2.2), se observó que era uno de los compuestos más abundantes liberados en los biofilms de *C. tropicalis*. Además, se evaluó que sucedía con la producción del metabolito por parte de la levadura ante la presencia del patógeno bacteriano.

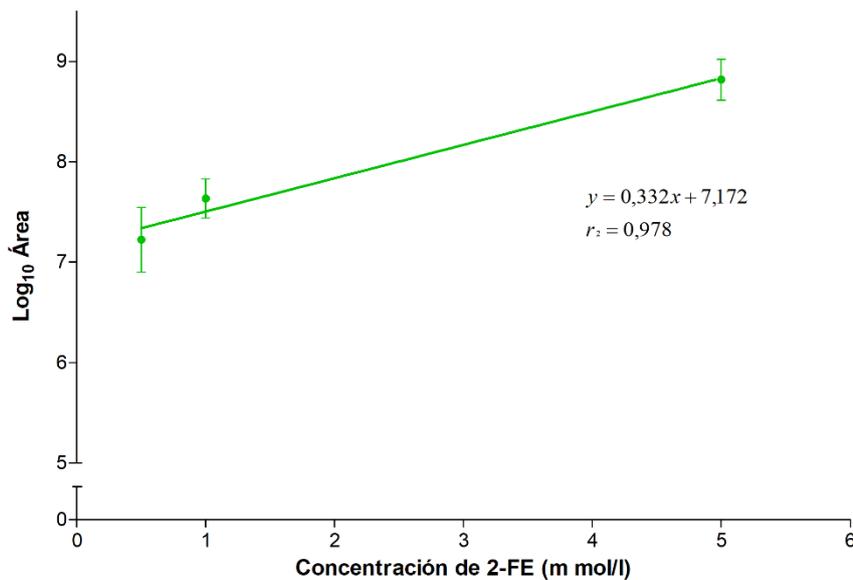
En este ensayo, los COV se extrajeron directamente sobre el biofilm mediante la técnica HS/SPME-GC/MS. Primero, se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones (0,5 mM, 1 mM y 5 mM) de 2-FE. Se añadieron 300  $\mu$ l de las soluciones de 2-FE a los viales de vidrios que contenían la superficie de AI y se analizaron como se describe en la sección III.2.2. Segundo, se evaluaron los biofilms de *C. tropicalis* en presencia (duales) o ausencia de *L. monocytogenes* (monoespecie). Para la formación de biofilms, la suspensión ajustada de *C. tropicalis* se mantuvo en contacto con la superficie de AI durante 24 h. Luego, se renovó la matriz alimentaria, sin o con la suspensión de *L. monocytogenes*, hasta completar las 48 h. Después del período de incubación, se retiró el sobrenadante y se analizaron los

volátiles generados directamente del biofilm formado sobre la superficie de AI. En la **Figura 38** se muestran los viales que contenían las soluciones de 2-FE y los biofilms duales.



**Figura 38** Viales sellados con la superficie de acero inoxidable en presencia de 2-feniletanol y con los biofilms duales de *Candida tropicalis* y *Listeria monocytogenes*, antes y después de la extracción.

De los cromatogramas obtenidos de la curva de calibrado de 2-FE (**Figura 39**) y de los biofilms, se midió el área de los picos, estos valores se promediaron y se transformaron a  $\text{Log}_{10}$ . Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M} \pm \text{DE}$ .



**Figura 39** Curva de calibración de 2-feniletanol mediante la técnica de HS/SPME acoplado a GC/MS.

### III.4 Cuantificación de COV en biofilms mediante el método de estándar interno

En esta instancia se evaluaron los biofilms duales de *C. tropicalis* + *C. krusei*, y los biofilms formados por las dos levaduras en presencia de *L. monocytogenes*, *S. enterica* o *E. coli* O157:H7 sobre MUF. Además, como control, se analizaron los biofilms monoespecie de cada especie. El ensayo se llevó a cabo en los sobrenadantes de los biofilms a los cuales se les adicionó octanol (estándar interno) de acuerdo con el procedimiento descrito por Grondin et al. (2015) con algunas modificaciones. Para la formación de estos, se colocaron 3,5 ml de la suspensión ajustada correspondiente de *C. tropicalis* y/o *C. krusei* en un vial que contenía la MUF y se incubaron a 25 °C durante 24 h. Después, se retiró el inóculo de levaduras y se adicionó la suspensión ajustada de *L. monocytogenes*, *S. enterica* o *E. coli* O157:H7 durante 24 h más. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y previo a su análisis, se agregó 0,5 g NaCl y 1 µl de octanol (1 g/l) en el vial y este se selló con su tapa correspondiente. Los volátiles se extrajeron del sobrenadante con la fibra de DVB/CAR/PDMS. La fibra en el vial se expuso durante 30 min a 40 °C en un baño termostático; luego se insertó en el puerto de inyección del GC/MS a 250 °C y se mantuvo durante 20 min para la desorción térmica.

Se programó el GC/MS como se describe en la sección III.2.2. La identificación de metabolitos de los biofilms se logró comparando los espectros de masas con los de la biblioteca del sistema de datos y los tiempos de retención del octanol se compararon con los de las sustancias de referencia. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{DE}$ .

### III.5 Estrategias de remoción y prevención de biofilms

#### III.5.1 Efecto de TIR, FAR y 2-FE sobre biofilms de levaduras en acero inoxidable

Los resultados de la identificación de los COV de los biofilms de *C. tropicalis* revelaron la presencia de tres compuestos importantes: TIR, FAR y 2-FE, que como se ha descrito en la introducción (sección 1.3.1) cumplen la función de MQS en especies de *Candida* y participan en la regulación de la formación de biofilms. En consecuencia, se escogieron estas tres moléculas para determinar si la adición externa de las mismas a los biofilms de *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefyr* tiene algún efecto sobre estos últimos.

Para seleccionar las concentraciones de cada compuesto a evaluar se tuvieron en cuenta lo reportado por otros investigadores (Martins et al., 2010; Ramage et al., 2002), se evaluaron las siguientes concentraciones: 0,3, 0,6 y 1,2 mM para TIR; 0,05, 0,6 y 1,2 mM para 2-FE, y 0,05,

0,3 y 0,6 mM para FAR. La información de las soluciones correspondientes y su preparación se describe en la sección 7. Las suspensiones ajustadas de levaduras ( $10^6$  UFC/ml, monoespecie y mezcla de levaduras) se dejaron 2 h en contacto con la superficie de AI. Luego, la superficie se lavó una vez con agua estéril y se adicionó jugo de manzana con la concentración de alcohol correspondiente. Tras 2 h más de incubación, las superficies de AI se lavaron con agua estéril y se renovó el jugo con la molécula para analizar (tratamiento) y sin ella (controles) hasta completar las 6, 24 y 48 h de incubación. Asimismo, se vertieron las suspensiones sin las sustancias de prueba en la microplaca como control para cada ensayo, y se procedió de la misma forma que con los cultivos que contenían las sustancias sometidas a prueba. Las superficies se lavaron para remover las células no adheridas y se analizaron mediante recuento celular y microscopía de fluorescencia. Para conocer la reducción de las unidades logarítmicas que causa la presencia de las moléculas se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Unidades logarítmicas UFC/cm}^2 = \text{Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2_{\text{Control}} - \text{Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2_{\text{Tratadas}}$$

### III.5.2 Efecto de natamicina sola y en combinación con farnesol sobre biofilms

Como se ha explicado en la introducción general (apartado 5.2), NAT es un reconocido antifúngico que se utiliza en la industria alimentaria a nivel mundial. En esta sección, primero, se probaron concentraciones de 0,01, 0,3, 0,6 y 1,2 mM de NAT sobre un biofilm de *C. tropicalis* sobre AI durante 2, 6, 24 y 48 h, tal como se describe en III.5.1. A raíz de los resultados alcanzados, se trabajó con 0,01 mM de NAT y se lo combinó con 0,6 mM FAR. Esta concentración de FAR se seleccionó en función de los resultados obtenidos en III.5.1, mientras que la concentración de NAT 0,01 mM se eligió en función del límite máximo permitido por la FDA para los jugos de frutas. Las soluciones de NAT y FAR se prepararon como se describe en la sección 2.1 y se agregaron a los cultivos de las suspensiones ajustadas de las levaduras.

Con el fin de conocer si el efecto combinado de NAT+FAR sobre *C. tropicalis* presentaba un efecto sinérgico, se planteó el modelo propuesto por Chaudhry et al. (2017). Como se indica en la literatura (Greco et al., 1992), se usará el término sinergia para describir un resultado en el que la combinación de dos compuestos produce una mayor inhibición de los microorganismos que lo que se esperaría si los agentes estuvieran actuando de forma independiente. Sí nombramos a C como el recuento celular obtenido en el control (sin tratamiento), y a  $S_A$ ,  $S_B$  y  $S_{AB}$  como el recuento celular de los microorganismos “supervivientes” después del tratamiento con el agente A (FAR), el agente B (NAT) y la

combinación de A (FAR) y B (NAT), podemos decir que la fracción de células que sobreviven a A es  $S_A/C$ , de células que sobreviven a B es  $S_B/C$ , y así. Los autores plantean que para que exista un efecto sinérgico debe ocurrir lo siguiente:  $S_A/C \times S_B/C > S_{AB}/C$ , realizando las siguientes derivaciones:

$$\text{Eq (1) } \log(C) - \log(S_A) - \log(S_B) + \log(S_{AB}) < 0$$

Posterior al análisis de los efectos sobre *C. tropicalis*, la combinación NAT+FAR se evaluó en:

1) *En biofilms de R. mucilaginosa, C. krusei y C. kefyr y en la mezcla de levaduras.*

Cada suspensión de levadura (monoespecie) y la mezcla de levaduras se dejaron en contacto con la superficie de AI durante 2 h; luego se enjuagó la superficie de AI para remover las células libres (no adheridas) y se le adicionó la combinación NAT+FAR por 2, 6, 24 y 48 h más de incubación. En el caso de los biofilms monoespecie, también se evaluó el efecto de NAT 0,01 mM.

2) *En cultivos planctónicos (CP) y biofilms multiespecie.*

Para este experimento, se prepararon las siguientes suspensiones: mezcla de levadura + *L. monocytogenes*; mezcla de levadura + *S. enterica*, mezcla de levadura + *E. coli* O157:H7. En el caso de CP, NAT+FAR se colocaron al tiempo 0 y se dejaron con las suspensiones por 24 y 48 h a 25 °C; después de estos tiempos se realizaron los recuentos correspondientes. Las suspensiones con microorganismos + NAT+FAR se dejaron reposar durante 2 h sobre AI, y luego, tras un lavado, se añadió jugo de manzana en presencia o ausencia de los compuestos probados. Esta renovación del medio se realizó de igual manera tras 24 h y las superficies se incubaron hasta 48 h. Las muestras de AI se analizaron mediante microscopía de fluorescencia y las de MUF por SEM.

Paralelamente, se utilizaron como control muestras no tratadas (cultivos sin NAT+FAR) de la mezcla de levadura y de los biofilms mono y multiespecie, según corresponda en cada ensayo. La inhibición de los biofilms y de CP en presencia de NAT+FAR se expresó como unidades de reducción logarítmica, para ello se estableció la diferencia entre el  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> de control y  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> después del tratamiento. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS

### III.6 Identificación de COV en biofilms de *C. tropicalis*

Inicialmente, se caracterizaron los COV de los sobrenadantes de biofilms de *C. tropicalis* mediante extracción con disolventes y HS/SPME acoplado GC/MS. Según se muestra en la **Tabla 16**, se encontraron diferencias entre los dos métodos empleados para la identificación de los COV. En cuanto a la extracción con disolvente, el compuesto más abundante desde el día 2 hasta el día 21 fue 2-FE. Después de la incubación durante 28 días descendió notablemente el porcentaje relativo de 2-FE, mientras que el TIR, que inicialmente se hallaba entre la minoría, aumentó. N-acetil tiramina y prenol fueron otras de las moléculas que se detectaron en casi todas las muestras de sobrenadantes, pero que no estaban presentes en el jugo. Los volátiles detectados por HS/SPME en el jugo de manzana correspondieron a una mezcla de 94 % furfural y 6 % de metoxifenilo oxima. Los COV de los cultivos de *C. tropicalis*, detectados mediante HS/SPME, consistieron principalmente una mezcla de alcoholes amílicos, y 2-FE y FAR, aunque en porcentajes muy bajos.

**Tabla 16** Identificación de compuestos orgánicos volátiles en biofilms de *Candida tropicalis*.

	Extracción con solventes							HS/SPME		
	TR (min)	Jugo	Tiempo de incubación (días)					TR (min)	5	
			2	7	14	21	28			
5-Metil furfural	6,5	—	18,5	17,3	8,0	8,1	13,7	Alcohol isoamílico	4,1	54,2
Formiato de isobutilo	7,7	—	—	—	—	—	6,9	Alcohol amílico	4,2	16,0
Anhídrido succínico	7,9	—	—	9,8	—	5,2	—	Alcohol furfurílico	8,4	5,2
Ácido sórbico	9,1	—	—	3,7	5,5	2,2	3,6	Isoamilo acetato	8,9	1,6
2-Ácido furoico metil éster	9,5	4,3	—	—	—	0,6	—	Estireno	9,3	1,7
2-Fenil etanol	10,3	—	34,0	43,3	50,8	39,7	3,6	Metoxi fenil oxima ‡	11,5	2,4
2-Ácido furoico	10,5	20,5	16,2	—	8,6	—	—	2-Etil hexanol	17,9	0,8
Piranona	11,3	1,4	—	—	—	1,6	1,5	Di metil octanol	20,7	0,3
Anisole p-vinil	11,4	—	0,4	—	—	—	—	2-Fenil etanol	22,5	0,5
Prenol	12,3	—	—	—	2,9	1,4	1,9	Camphor	25,1	0,8
Butenilmetileter	12,4	—	5,1	—	—	—	—	Di metil acetal de citronela	27,4	4,2

5-Hidroximaltol	12,5	1,4	—	0,9	—	1,3	—	Farnesol	45,6	0,1
5-Metil-2-furanmetanol	13,5	—	1,4	—	—	—	—	Farnesene	45,9	0,6
5-Hidroximetilfurfural	13,7	65,3	—	—	—	—	—	Escualeno	46,3	0,1
2'-Furanil-1,2-etanodiol	13,9	—	—	—	—	20,1	33,1	Nerolidol	52,1	3,1
10-Dodeceno-1-ol propionato	14,1	—	1,2	—	—	—	—	Trimetil pentanodiol	54,0	1,2
Metil 2-feniletanoato	14,2	—	—	—	3,0	—	—	Miristato de isopropilo	60,9	0,8
Cavicol	14,3	—	0,7	—	—	—	—			
1,3-Octanodiol	14,4	5,9	5,1	2,6	3,4	4,9	6,3			
Ácido butano dioico	17,2	—	2,7	0,9	0,5	—	—			
Tirosol	18,9	—	4,8	14,2	5,8	6,4	14,1			
Acetato nerolidol	19,3	—	0,4	—	—	—	—			
N-acetil tiramina	20,9	—	5,3	5,2	11,4	8,2	7,8			
Betulina	21,7	—	0,9	—	—	—	—			
Total		98,8	96,9	98,0	99,8	99,7	92,6			93,6
NI <sup>†</sup>		1,2	3,1	2,0	0,2	0,3	7,4			6,4

\*Los valores se expresan como porcentajes relativos y los compuestos se enumeran por orden de elución de acuerdo con los análisis en GC-MS. † No identificado. ‡ Este compuesto también se detectó en el jugo por el mismo método.

### III.7 Cuantificación de 2-feniletanol en biofilms de *C. tropicalis* y *L. monocytogenes*

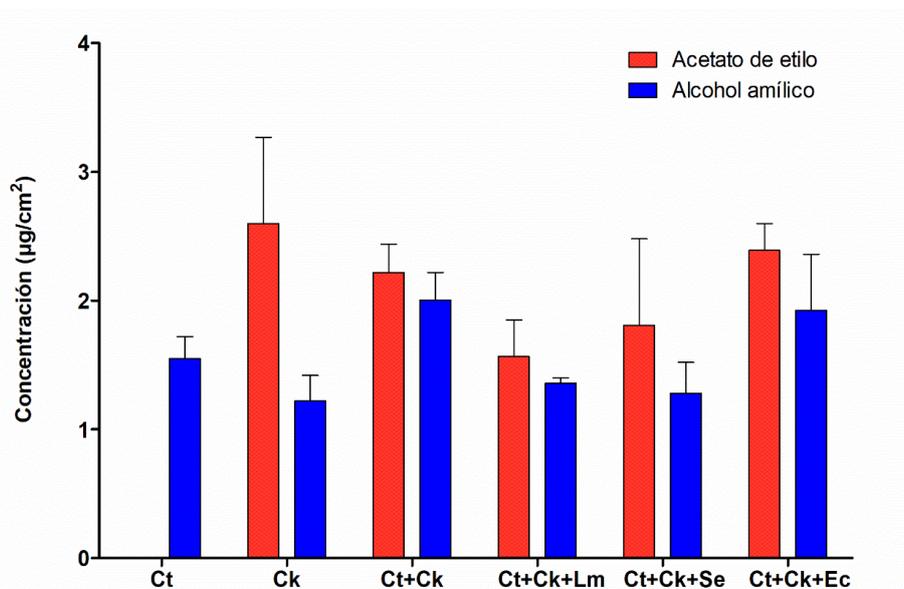
La concentración de 2-FE en los biofilms se calculó a partir de la curva de calibración obtenida del análisis de las áreas de los cromatogramas (**Figura 39**). Al analizar la concentración de 2-FE directamente sobre los biofilms, se observó un amplio rango de valores en los mono especie de *C. tropicalis*, mientras que en los biofilms duales el valor se mantuvo cercano a la producción basal del compuesto (**Tabla 17**). La presencia de *L. monocytogenes* altera la concentración máxima de 2-FE en *C. tropicalis*, pero no su producción basal. Aunque resulta trabajoso lograr reproducibilidad mediante HS/SPME, se han podido estimar las concentraciones de este compuesto en los biofilms, lo que permite determinar valores basales e interpretar resultados en experimentos donde se ha agregado el volátil en forma exógena.

**Tabla 17** Cuantificación de 2-feniletanol mediante HS/SPME-GC/MS en biofilms mono especie de *Candida tropicalis* y duales con *Listeria monocytogenes* después de 48 h.

Biofilms	2-FE (µM)
<i>C. tropicalis</i>	129 a 425
<i>C. tropicalis</i> + <i>L. monocytogenes</i>	170,70 ± 22,20

### III.8 Identificación de COV en biofilms de levaduras y bacterias

Se identificaron dos compuestos liberados por *C. tropicalis* y *C. krusei*: acetato de etilo y alcohol amílico (**Figura 40**); a diferencia de las levaduras, no se detectaron compuestos relevantes en los biofilms monoespecie de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7. *C. krusei* produjo acetato de etilo y alcohol amílico, en contraste con *C. tropicalis*, que solo generó alcohol amílico. La concentración de acetato de etilo fue de aprox. 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en levaduras y este valor disminuyó en presencia de *L. monocytogenes* (0,65  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) y *S. enterica* (0,41  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Respecto al alcohol amílico, este alcanzó su valor máximo (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en el biofilm de *C. tropicalis* + *C. krusei* y el menor valor en el biofilm de *C. krusei* (1,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar la concentración de alcohol en los biofilms de levaduras con aquellos que se formaron en presencia de bacterias patógenas alimentarias.

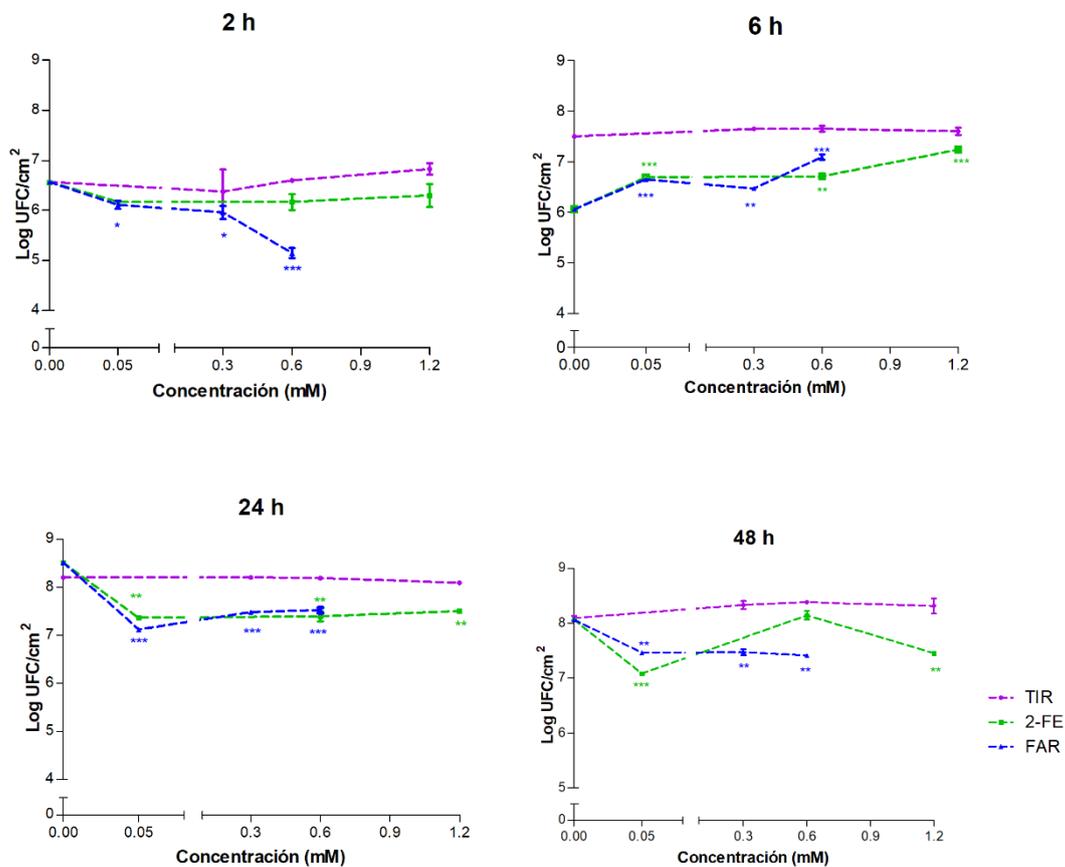


**Figura 40** Identificación y cuantificación de COV mediante el método de estándar interno en biofilms multiespecie desarrollados sobre MUF después de 48 h. Ct: *Candida tropicalis*; Ck: *Candida krusei*; Lm: *Listeria monocytogenes*; Se: *Salmonella enterica*; Ec: *Escherichia coli* O157:H7.

### III.9 Efecto de tirosol, 2-feniletanol y farnesol en biofilms de levaduras sobre AI

Como hemos mencionado, inicialmente, se evaluaron los efectos de las diferentes concentraciones de TIR, 2-FE y FAR sobre biofilms de *C. tropicalis* en diferentes etapas de su

formación (**Figura 41**). El agregado externo de TIR no modificó ( $p > 0,05$ ) los recuentos de la levadura en ninguna de las concentraciones evaluadas (0,3, 0,6 y 1,2 mM). Mientras que la adición de 2-FE produjo un efecto independiente de la concentración (0,3, 0,6 y 1,2 mM), que varió en función del tiempo. Por ejemplo, tras 2 h de incubación en presencia de 2-FE, la adhesión de *C. tropicalis* no se vio afectada ( $p > 0,05$ ), pero aumentó tras 6 h; lo contrario sucedió a las 24 h ( $p < 0,01$ ) y a las 48 h a una concentración de 1,2 mM y 0,05 mM. En el caso de FAR (0,05- 0,3 y 0,6 mM), el recuento celular se redujo aprox. en una unidad logarítmica tras 2 y 48 h de incubación. A las 2 h, el efecto de FAR sobre *C. tropicalis* fue dependiente de la dosis; la mayor reducción ( $p < 0,001$ ) respecto al control se obtuvo con 0,6 mM de FAR.



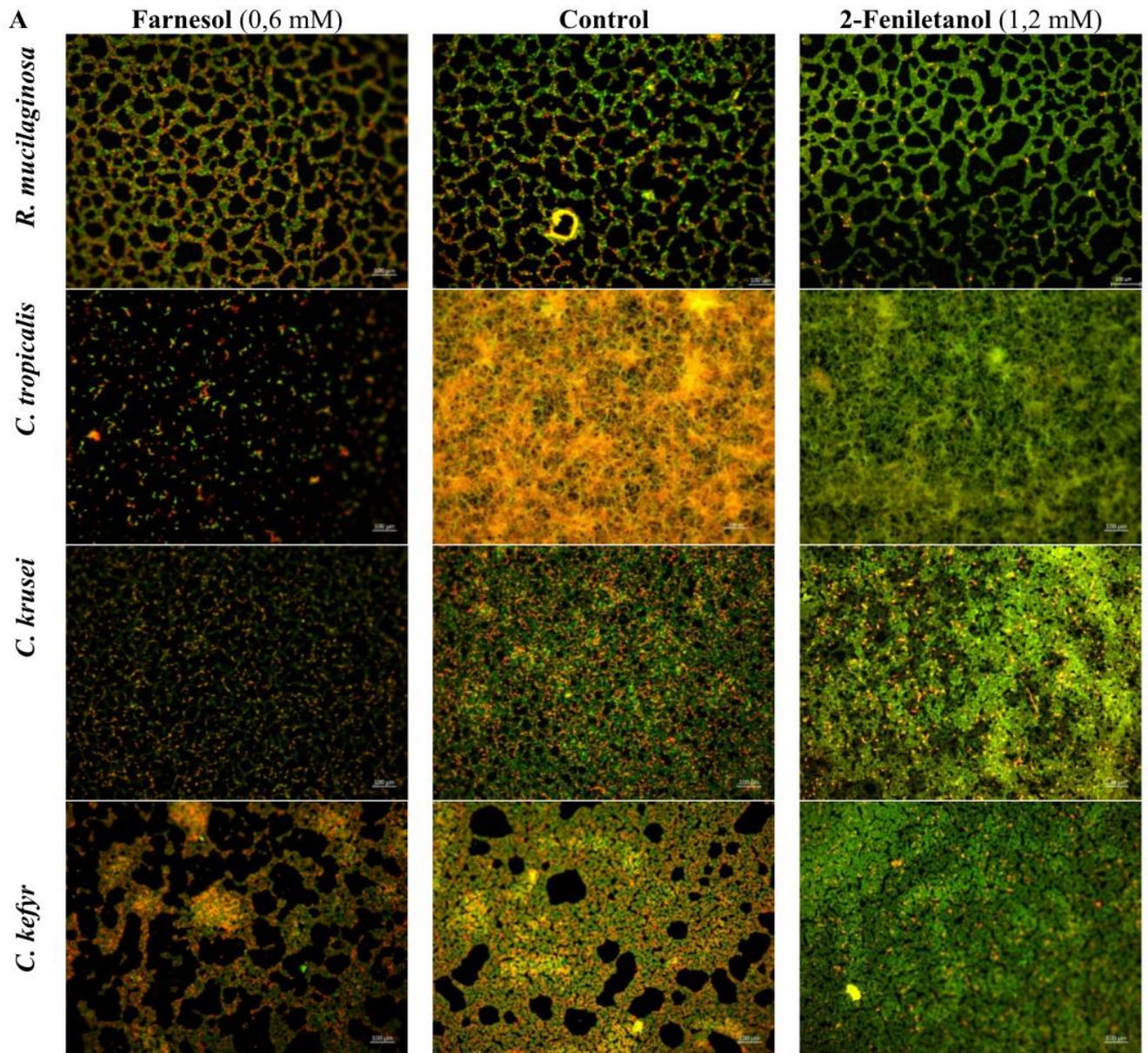
**Figura 41** Recuentos celulares de los biofilms de *Candida tropicalis* tratadas con ● tirosol (TIR), ■ 2-feniletanol (FE) y ▲ farnesol (FAR) a diferentes concentraciones (0,05–1,2 mM) y etapas del desarrollo del biofilms (2, 6, 24 y 48 h).

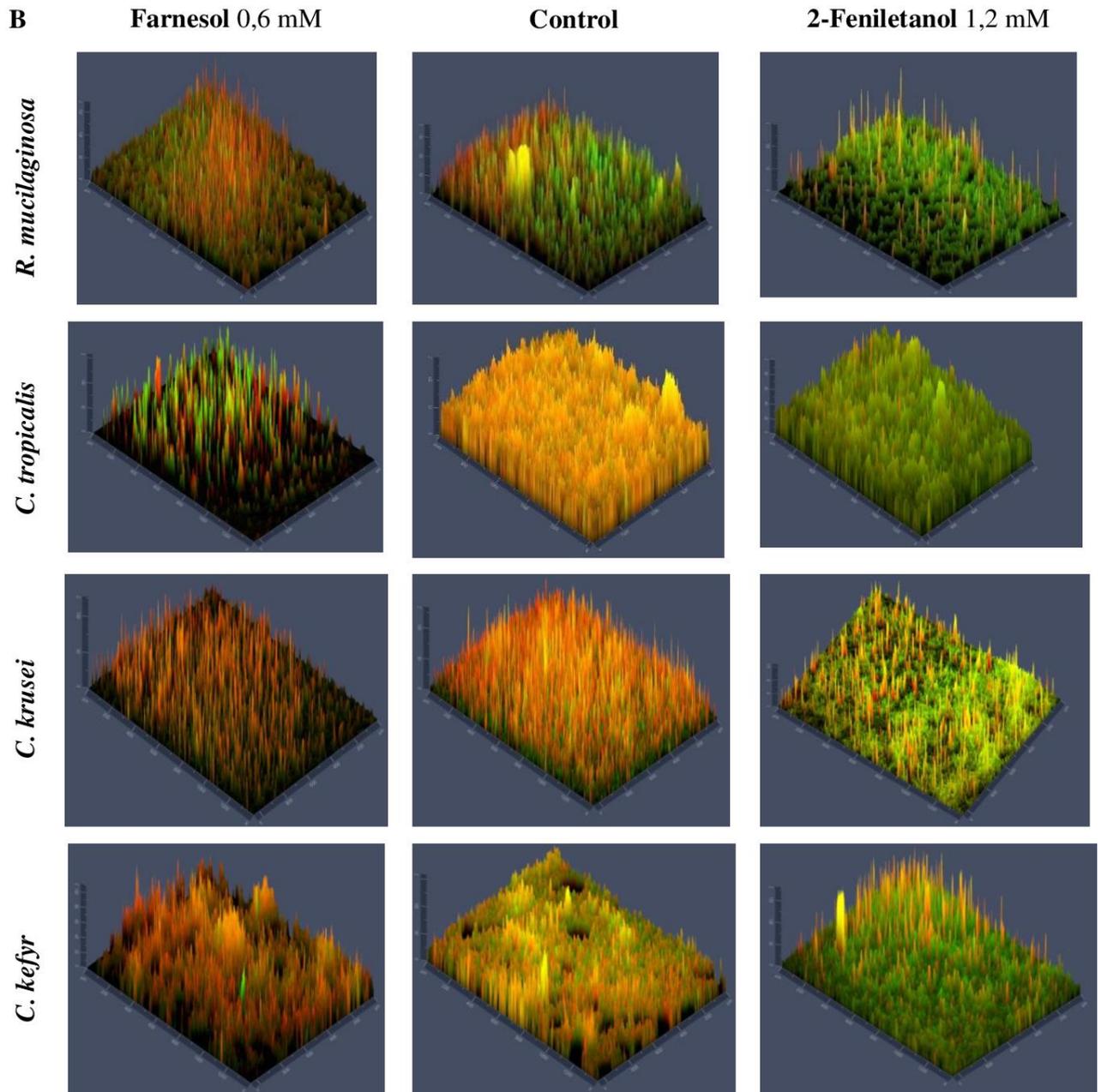
Los números de los controles son aquellos valores a 0 mM para cada hora de incubación. Las diferencias significativas se expresan en referencia al control.

Posteriormente, sobre la base de los resultados anteriores se decidió evaluar el efecto de FAR 0,6 mM y 2-FE 1,2 mM sobre la morfología de *C. tropicalis* tras 2 h de incubación y también

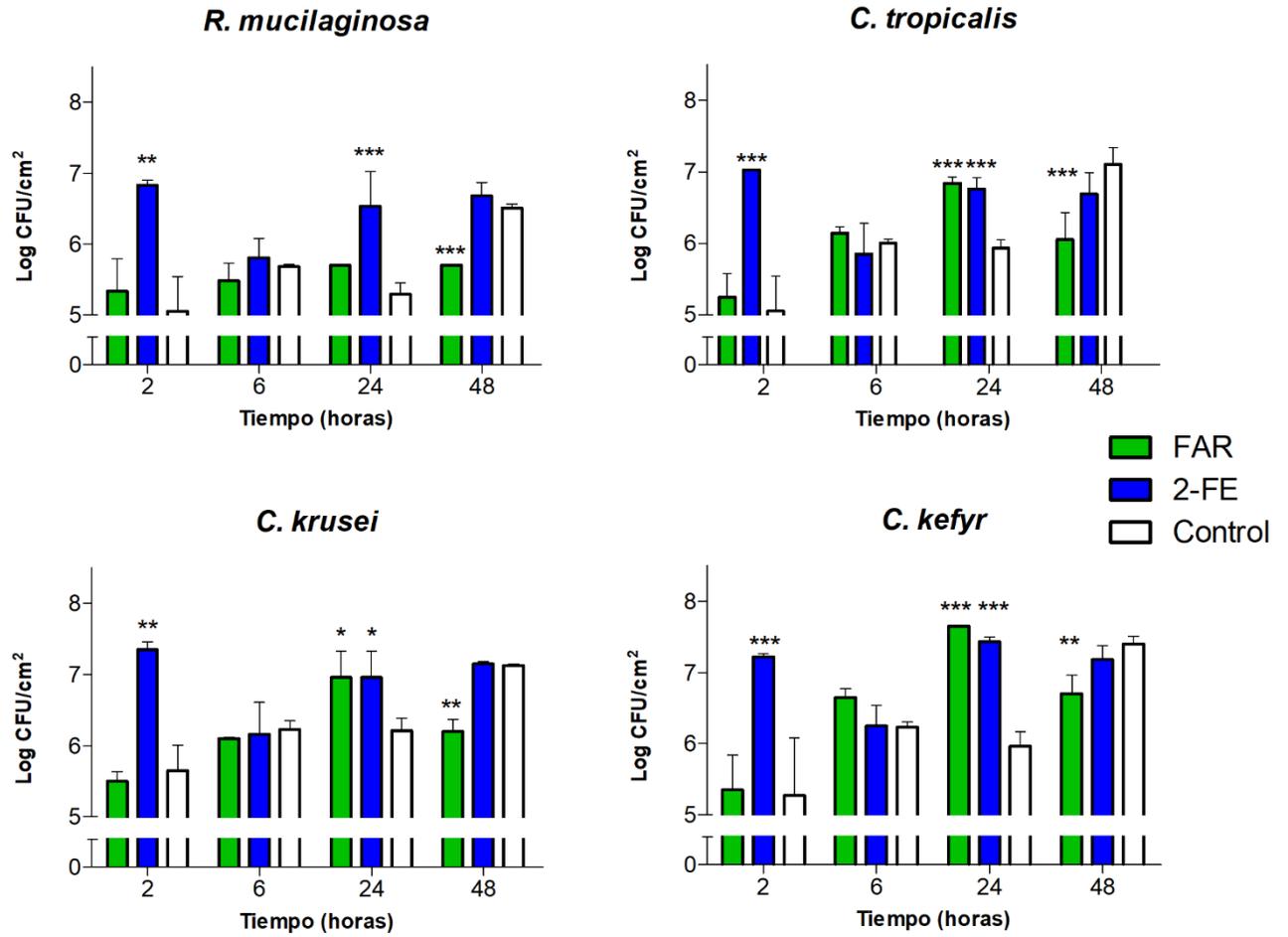
sobre *R. mucilaginosa*, *C. krusei* y *C. kefyr* (**Figura 42**). Los efectos fueron evidentes en las etapas iniciales de formación de biofilms (2 h). FAR 0,6 mM redujo la colonización de la superficie de todas las especies de *Candida*, mientras que 2-FE 1,2 mM aumentó la densidad de los biofilms en comparación con los controles. En *R. mucilaginosa* no se observaron cambios en la morfología. En la **Figura 42 B** se presentan las imágenes 2.5D procedentes de la **Figura 42 A**; en ella es posible apreciar las diferencias en cuanto a la colonización de la superficie de AI y también la intensidad de la fluorescencia, en las cuales el color rojo representa células de levaduras con las membranas dañadas y el verde, células con membranas intactas.

Por último, se evaluó el efecto de FAR, TIR y 2-FE sobre los biofilms de la mezcla de levaduras (**Figura 43** y **Figura 44**). Los resultados indicaron que TIR (1,2 mM) no modifica el recuento celular ( $p < 0,05$ ) de cada especie de levadura dentro de la mezcla, a diferencia de 2-FE, que, durante la etapa inicial de adhesión (2 h), aumenta aprox. 2 unidades logarítmicas con relación a su control (**Figura 43**). Sin embargo, el recuento total de la mezcla de levaduras en presencia de 2-FE (datos no presentados) no se desvió significativamente del control ( $p > 0,05$ ). Mientras tanto, FAR produjo un efecto estimulante en las especies de *Candida* tras 24 h, y una reducción de aprox. una unidad logarítmica de cada especie dentro de la mezcla de levaduras tras 48 h, en comparación con los controles. Con respecto al recuento total de las levaduras tratadas con FAR, se observaron reducciones significativas tras 2 h ( $p < 0,05$ ) y 48 h ( $p < 0,01$ ), siendo estas de una unidad logarítmica. En cuanto a la morfología (**Figura 44**), la actividad estimulante del 2-FE se hizo evidente tras 6 h sobre la mezcla de levaduras, persistiendo el efecto en el tiempo, en tanto que la inhibición ejercida por FAR se observó claramente durante la etapa de adhesión inicial (2 h) con presencia de zonas de disrupción en los biofilms maduros (24 h y 48 h).



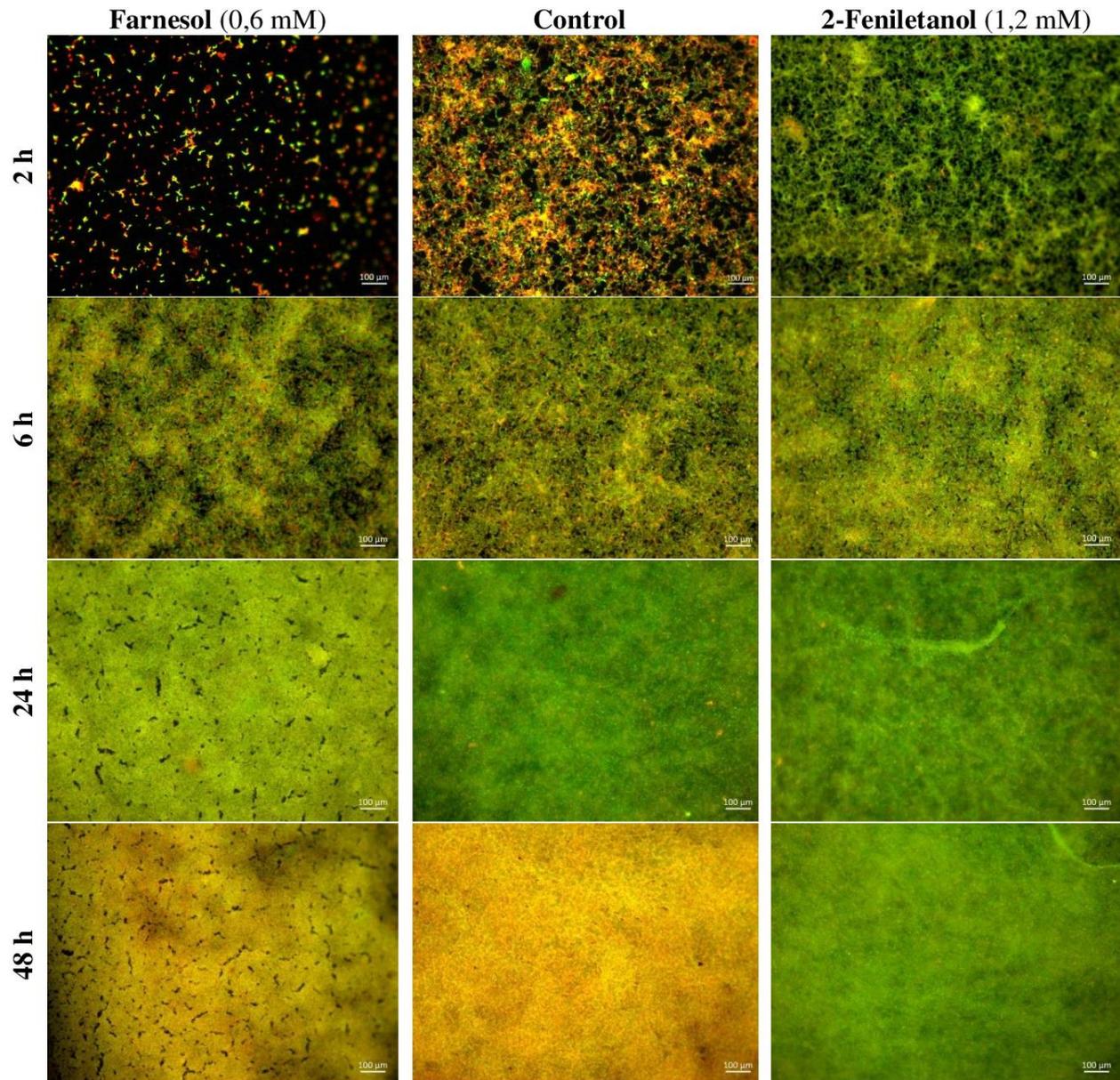


**Figura 42** Imágenes 2D (A) y 2.5D (B) obtenidas por microscopía de fluorescencia de biofilms mono especie de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr* sobre acero inoxidable, tratados con farnesol 0,6 mM (izquierda) y 2-feniletanol 1,2 mM (derecha) por 2 h y el control (centro). El color verde representa presencia de células con la membrana celular intacta y el color rojo con la membrana dañada. Magnificación 10 X.



**Figura 43** Recuento diferencial de la mezcla de levaduras sobre acero inoxidable expuesto a farnesol 0,6 mM y 2-feniletanol 1,2 mM en diferentes etapas del desarrollo del biofilms (2–48 h).

Datos expresados como Log CFU/cm<sup>2</sup>±DE. Las diferencias significativas se expresan en referencia al control.



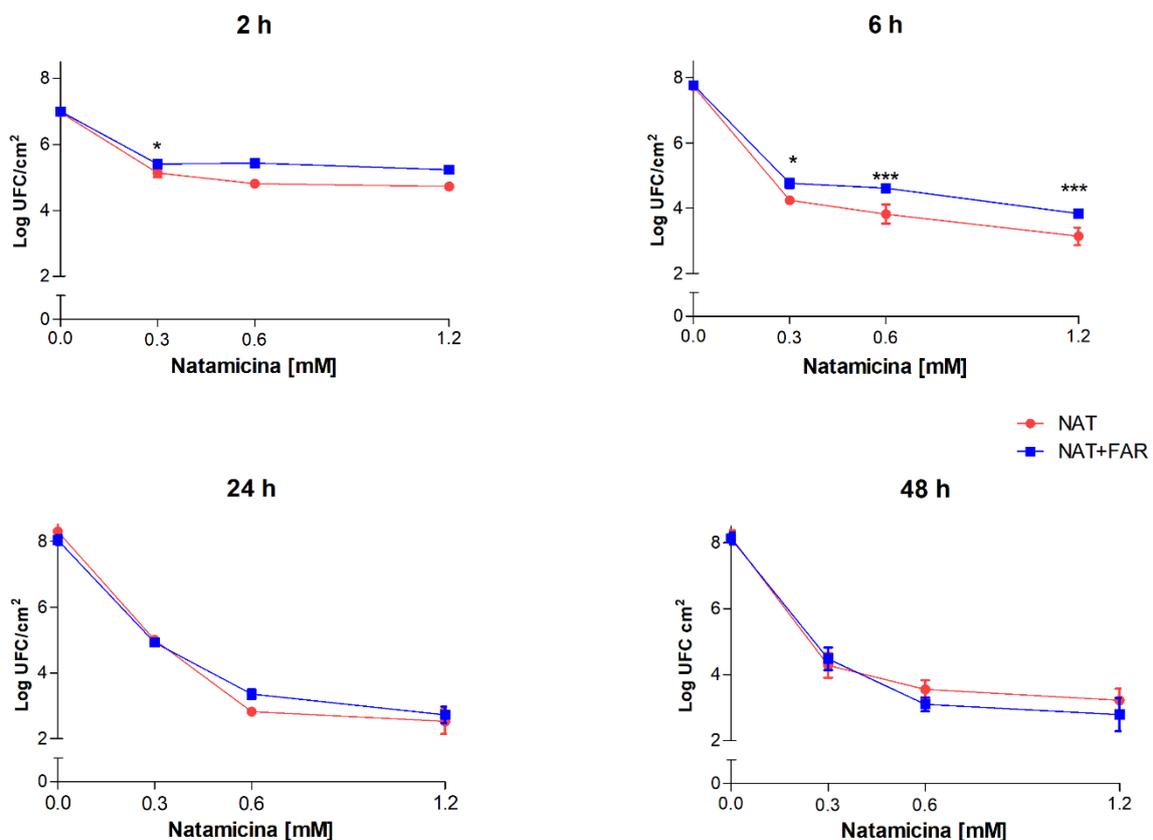
**Figura 44** Imágenes de microscopía de fluorescencia sobre el efecto de farnesol 0,6 mM (izquierda) y 2-feniletanol 1,2 mM (derecha) sobre biofilms de mezcla de levaduras en un período de 2 a 48 h. Aumento 10X.

### III.10 Estrategia de remoción de biofilms con NAT en combinación con FAR

#### III.10.1 Efecto de NAT sola y en combinación con FAR sobre biofilms monoespecie de levaduras sobre acero inoxidable

En un principio, el efecto de NAT se analizó sobre biofilms monoespecie de *C. tropicalis* desarrollados sobre AI, ya que se ha demostrado que, dentro de las cuatro especies bajo estudio,

*C. tropicalis* es quién le confiere estructura y estabilidad a los biofilms (Capítulo I). La **Figura 45** presenta los resultados obtenidos de los recuentos celulares de *C. tropicalis* después de ser expuesta a diferentes concentraciones de NAT y NAT+FAR. NAT alteró profundamente el recuento de células adheridas ( $p < 0,001$ ), modificando la estructura del biofilm de *C. tropicalis* (figuras no presentadas) en todas las etapas (2-48 h) y en todas las concentraciones (0,3–1,2 mM). Tras 24 h de incubación y a concentraciones de 0,6 y 1,2 mM de NAT, el recuento celular de *C. tropicalis* disminuyó más de 5 unidades logarítmicas respecto al control. La adición de FAR 0,6 mM estimuló el crecimiento en las primeras etapas del desarrollo de los biofilms (6 h) y no modificó el efecto de NAT tras 24-48 h en biofilms de *C. tropicalis*.

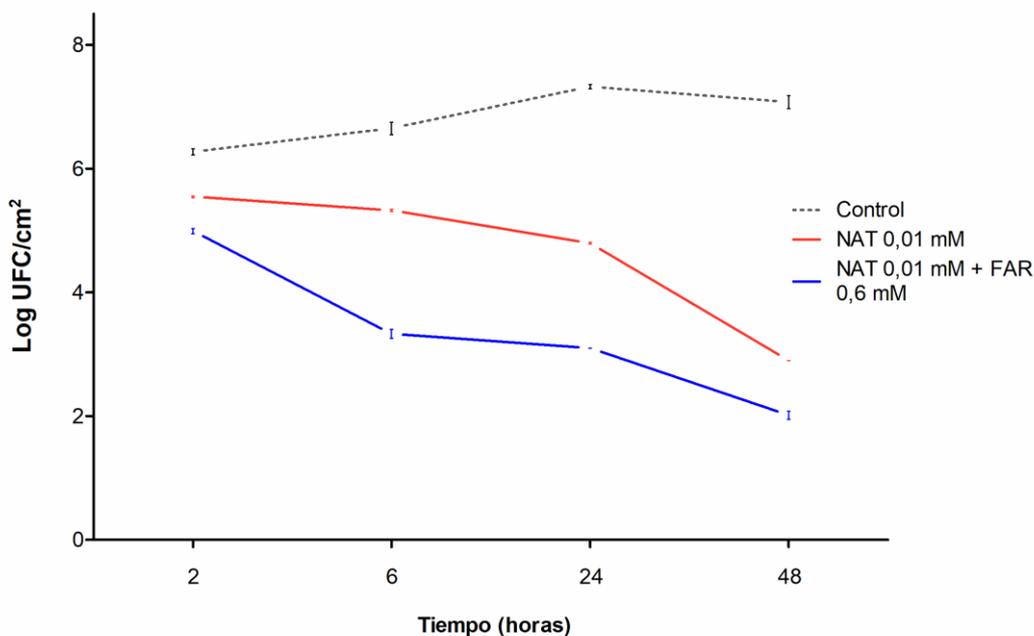


**Figura 45** Recuentos celulares de los biofilms de *Candida tropicalis* sobre acero inoxidable tratados con ● natamicina (0,3–1,2 mM) y en combinación con farnesol 0,6 mM ■ durante 2, 6, 24, y 48 h.

Los recuentos celulares de los controles son aquellos valores a 0 mM por cada tiempo de incubación. Las diferencias significativas entre se expresan natamicina vs. natamicina + farnesol.

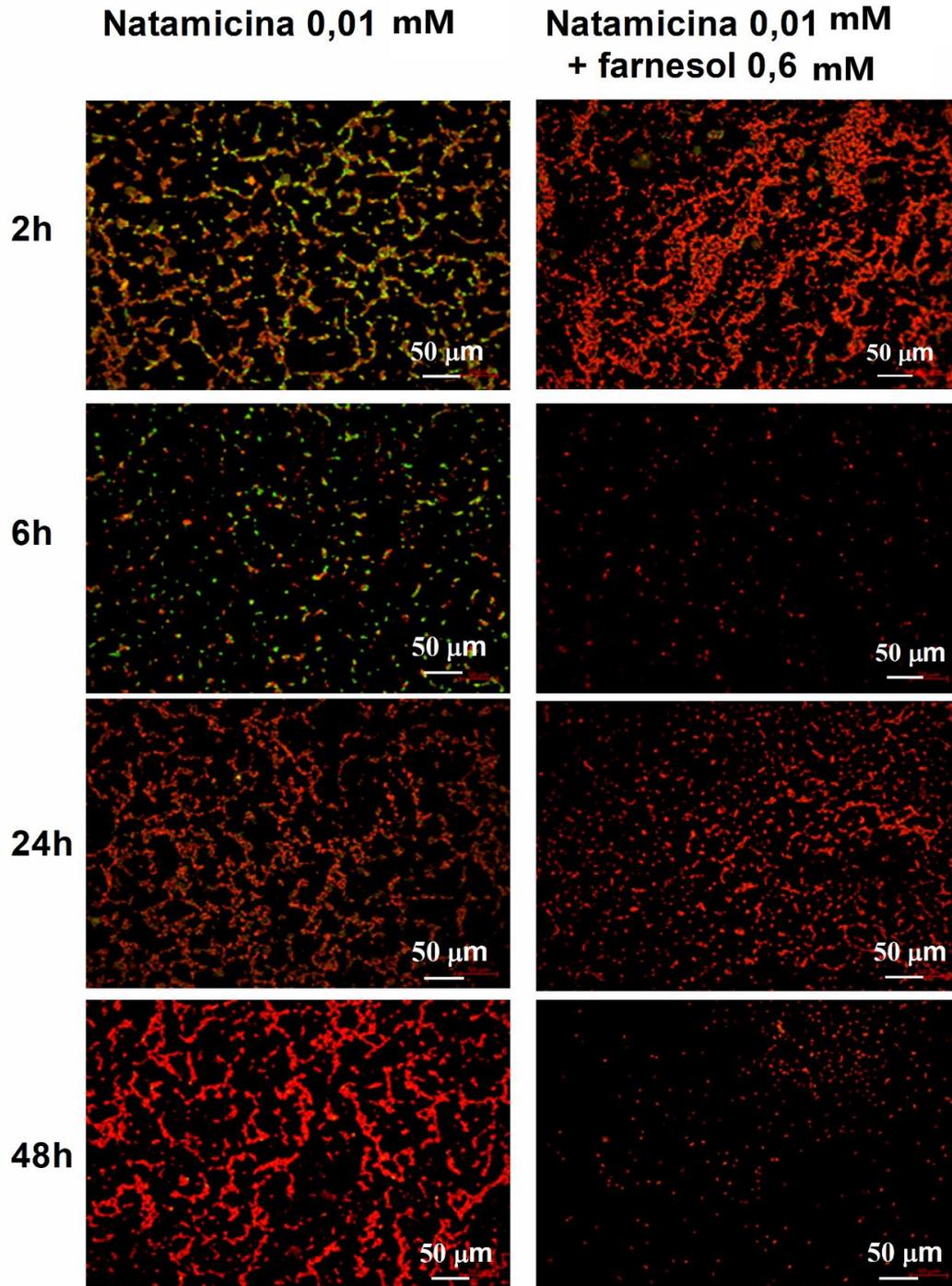
Si bien se evaluó un amplio rango de concentraciones de NAT, estas son consideradas elevadas para la industria de producción de jugo de manzana. Por ello se disminuyó la concentración de NAT a 0,01 mM para combinarla con FAR, la cual está cerca del máximo aceptado para la

adición directa en los jugos. Los recuentos celulares de *C. tropicalis* (**Figura 46**) y las imágenes de microscopía de fluorescencia (**Figura 47**) revelaron que a partir de las 6 h de exposición a 0,6 mM de FAR y 0,01 mM de NAT, la densidad celular se redujo, con la disrupción total de la estructura tridimensional de *C. tropicalis*. Si el número de UFC en los controles es considerado como una adhesión del 100 %, en cada momento de incubación, la NAT causó una reducción de 12, 20, 35 y 60 % a las 2, 6, 24 y 48 h respectivamente. La adición de FAR causó una reducción adicional de 9, 30, 23 y 12 %, respectivamente. Siguiendo la ecuación (*Eq 1*) propuesta por Chaudhry et al. (2017), se detectó que el efecto de la combinación de NAT+FAR es mayor que el efecto de NAT o FAR por separado tras 6, 24 y 48 h de incubación. Es decir, que en estos tres tiempos NAT+FAR presentan un efecto sinérgico sobre los biofilms de *C. tropicalis*. Otro resultado que emerge es que NAT causó una disminución de más de 4 unidades logarítmicas a las 48 h y FAR mejoró el efecto inhibitorio de NAT (alrededor de 1 unidad logarítmica); solamente la combinación generó una reducción logarítmica de 5 unidades logarítmicas tras 48 h de incubación.



**Figura 46** Recuento celular de *Candida tropicalis* unidas al acero inoxidable después del tratamiento con natamicina 0,01 mM y en co-tratamiento con farnesol 0,6 mM en diferentes etapas del desarrollo del biofilm (2-48 h). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en todos los puntos ( $p < 0,001$ ).

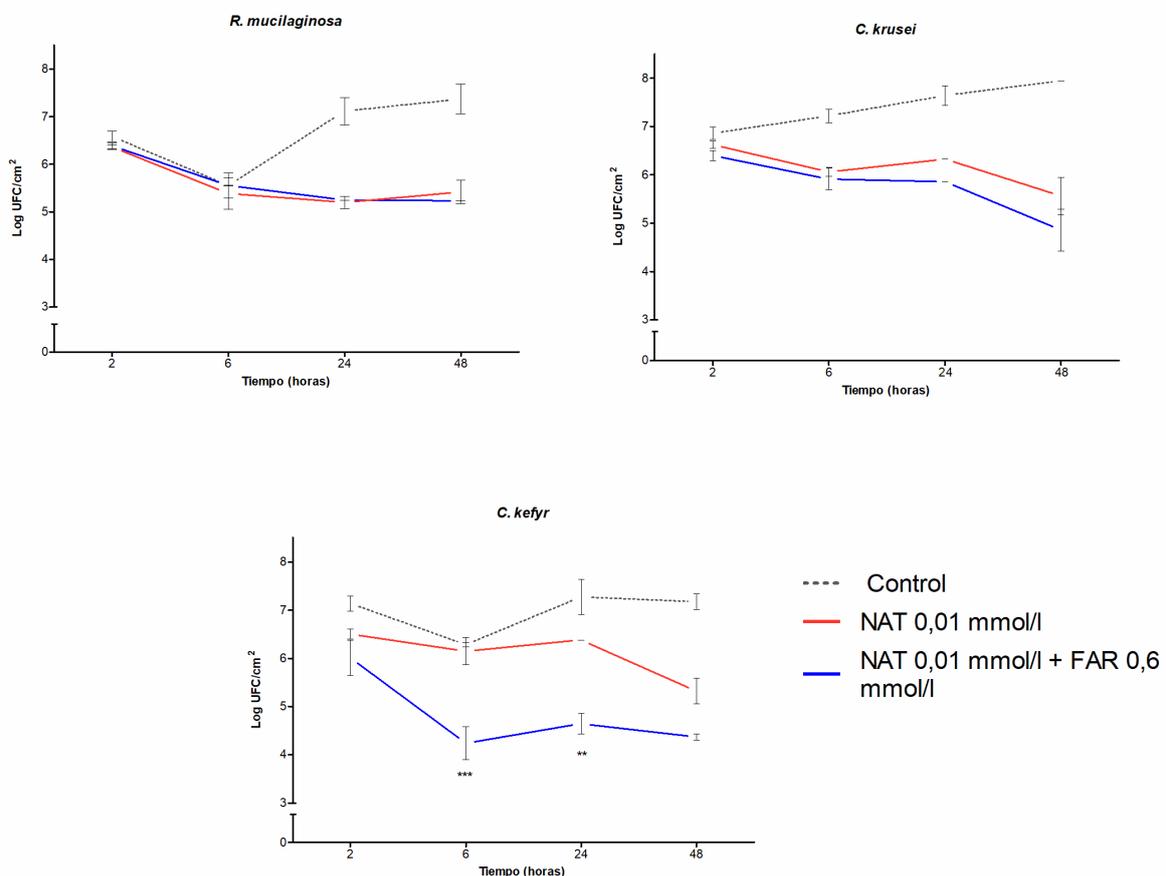
Datos expresados como Log CFU/cm<sup>2</sup>, las barras representan el DE de los resultados obtenidos por triplicado.



**Figura 47** Imágenes de microscopía de fluorescencia de biofilms de *Candida tropicalis* sobre acero inoxidable después del tratamiento con natamicina 0,01 mM (izquierda) y en combinación con farnesol 0,6 mM (derecha) en cada etapa del desarrollo del biofilm (2–48 h). El color rojo indica daño en la membrana de las levaduras. Aumento 10X.

Seguidamente, se evaluó el efecto NAT 0,01 mM con y sin FAR 0,6 mM sobre los biofilms monoespecie de *R. mucilaginosa*, *C. krusei* y *C. kefyr* (**Figura 48**). En *R. mucilaginosa*, los

efectos de los compuestos se hicieron evidentes a partir de las 24 h ( $p < 0,001$ ), con una reducción logarítmica de 2 UFC/cm<sup>2</sup>, pero no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos. Resultados similares se hallaron para *C. krusei*, con la diferencia de que la reducción de la adhesión es notoria a partir de las 6 h ( $p < 0,05$ ). En este caso, la combinación NAT+FAR aumenta aprox. un 6 % la inhibición tras 24 h de incubación. Finalmente, en *C. kefyri* NAT 0,01 mM tiene efecto sobre el biofilm a las 48 h ( $p < 0,001$ ), mientras que, con la combinación, comienza a ser significativa tras 2 h ( $p < 0,05$ ), alcanzando una reducción de aprox. 3 unidades logarítmicas tras 48 h. Si al control de *C. kefyri* lo tomamos como el 100 %, el agregado de FAR favorece la inhibición un 7, 30, 24 y 13 % a las 2, 6, 24 y 48, respectivamente.

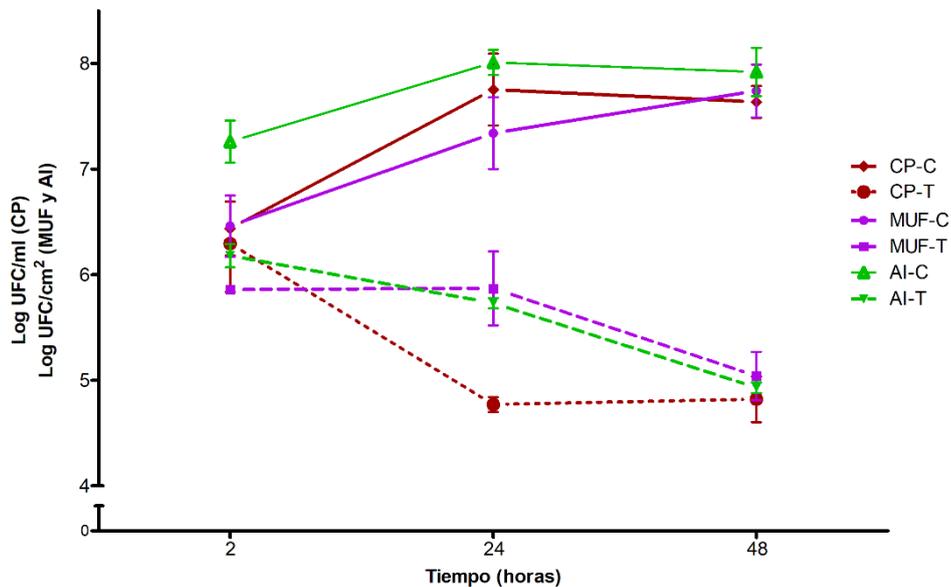


**Figura 48** Recuento celular de los biofilms monoespecie sobre acero inoxidable de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida krusei*, *Candida kefyri* después del tratamiento con natamicina 0,01 mM y en co-tratamiento con farnesol 0,6 mM en diferentes etapas del desarrollo del biofilm (2-48 h).

Datos expresados como Log CFU/cm<sup>2</sup>±DE de los resultados obtenidos por triplicado. Las diferencias significativas se expresan entre natamicina vs. natamicina+farnesol.

### III.10.2 Efecto de NAT+FAR sobre cultivos planctónicos y biofilms multiespecie

En esta sección se evaluó el efecto de NAT+FAR sobre la mezcla de levaduras en presencia y ausencia de las bacterias patógenas. Los ensayos se realizaron tanto en CP (células libres) como formando biofilms adheridos a AI y MUF. Los recuentos celulares de la mezcla de levadura en presencia de NAT+FAR (**Figura 49**) se redujo aprox. 3, 2 y 1,5 unidades logarítmicas en CP y en los biofilms sobre AI y MUF, respectivamente, tras 24 h de incubación. La reducción sobre los CP fue mayor ( $p < 0,001$ ) que la reducción sobre las células adheridas. Al analizar únicamente las adhesiones, la diferencia en los recuentos celulares entre controles y tratamientos sobre AI comienza a ser estadísticamente significativa (1,08 unidades logarítmicas,  $p < 0,001$ ) tras 2 h de incubación, y en MUF tras 24 h (1,47 unidades logarítmicas,  $p < 0,001$ ). Asimismo, se evidenció una importante susceptibilidad de la mezcla de levaduras a NAT+FAR después de 48 h, siendo los valores de adhesión de  $7,74 \pm 0,25$ -  $7,92 \pm 0,23$  log UFC/cm<sup>2</sup> en el control, y de  $5,04 \pm 0,23$  y  $4,93 \pm 0,05$  log UFC/cm<sup>2</sup> en los tratados en MUF y AI, respectivamente.

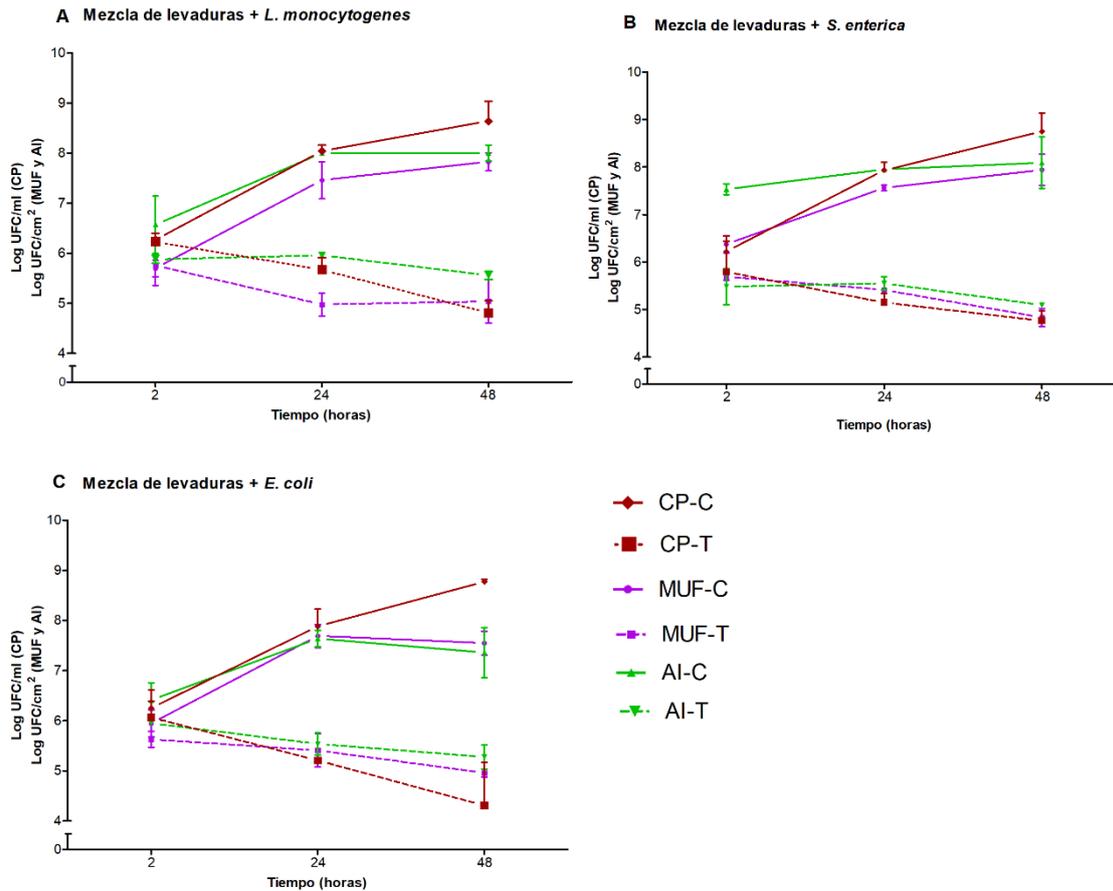


**Figura 49** Recuento total de la mezcla de levaduras en cultivos planctónicos (CP), adheridas sobre membranas de ultrafiltración (MUF) y acero inoxidable (AI) después de la exposición a natamicina 0,01 mM + farnesol 0,6 mM por 2, 24 y 48 h. (C) Control, biofilms no tratados; (T) Tratado, biofilms con natamicina + farnesol.

Datos expresados como Log CFU/ml $\pm$ DE para CP y como Log CFU/cm<sup>2</sup> para las adhesiones sobre AI y MUF, las barras representan el DE de resultados obtenidos por triplicado.

Posteriormente, la combinación NAT+FAR se evaluó sobre las suspensiones multiespecie (mezcla de levadura con *L. monocytogenes*, *S. enterica* o *E. coli*) en los CP y adheridos a MUF y AI (**Figura 50**). En todas las combinaciones de microorganismos y en todas las condiciones de evaluación (CP, adheridas en MUF y sobre AI), se pudo observar una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) de la mezcla de levaduras tras 24 y 48 h de incubación con relación a los controles (no tratados). En los recuentos de las levaduras en presencia de *L. monocytogenes* (**Figura 50, A**) no se apreciaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre CP vs. adheridas después del tratamiento. No obstante, en CP las levaduras se mostraron más sensibles al tratamiento tras 48 h, ya que aquí se reduce un 10 % más (44 % en total) en CP que en MUF y sobre AI (si consideramos como 100 % los recuentos del control). Se observó un comportamiento similar en los biofilms que contenían *S. enterica* y *E. coli* (**Figura 50, B y C**). Después de 48 h de tratamiento con NAT+FAR, la población de levaduras se reduce en 4 unidades logarítmicas (aprox. 45 %) en los CP, mientras que en los biofilms sobre AI y MUF el máximo fue de 3 y 2 unidades logarítmicas para *S. enterica* y *E. coli*, respectivamente. Por otro lado, al comparar el efecto entre la adhesión en MUF y AI, se observó que en los biofilms multiespecie con *L. monocytogenes* las reducciones se hacen evidentes después de 2 h sobre AI ( $p < 0,05$ ) y después de 24 h en MUF ( $p < 0,001$ ); con *S. enterica* tras 2 h tanto sobre AI ( $p < 0,001$ ) como en MUF ( $p < 0,05$ ) y con *E. coli* después de las 24 h ( $p < 0,001$ ).

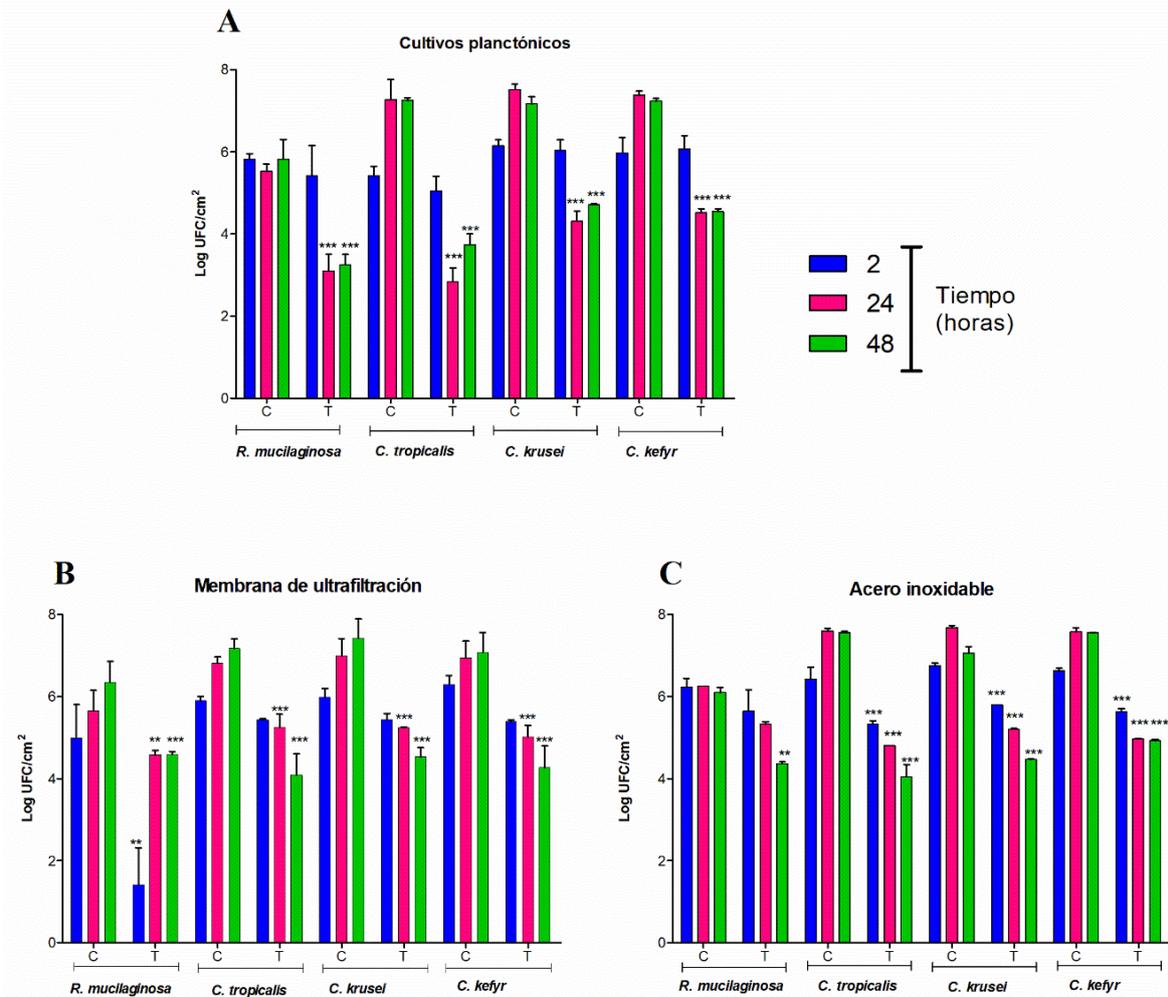
Además, se evaluó el comportamiento de cada especie de levadura tanto en los biofilms de la mezcla de levaduras como en los multiespecie mediante el recuento diferencial en CHROMagar *Candida* (**Figura 51**). No se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los biofilms en presencia y ausencia de bacterias al evaluar el efecto de NAT+FAR para cada especie de levadura. Por esta razón, la **Figura 51** solo presenta los resultados de la mezcla de levaduras en ausencia de bacterias patógenas. Al considerar como 100 % los recuentos en los controles, NAT+FAR disminuyó la viabilidad de *C. tropicalis*, *R. mucilaginosa*, *C. krusei* y *C. kefyr* en un 76, 54, 38 y 34 % en CP después de 48 h. Estos porcentajes fueron distintos a los alcanzados en la adhesión de la mezcla de levaduras; el crecimiento de *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* y *R. mucilaginosa* se redujo aprox. un 43, 40, 39 y 28 %, respectivamente, en ambas superficies tras 48 h. En los tres casos, NAT+FAR reduce significativamente ( $p < 0,001$ ) la viabilidad celular en CP y en las adheridas sobre MUF y AI a lo largo del tiempo.



**Figura 50** Cuantificación de la mezcla de levaduras en biofilms multiespecie en cultivos planctónicos (CP), adheridas en membranas de ultrafiltración (MUF) y en acero inoxidable (AI) después de la exposición a natamicina 0,01 mM + farnesol 0,6 mM en presencia de *Listeria monocytogenes* (A), *Salmonella enterica* (B), *Escherichia coli* O157:H7 (C). Tiempos de incubación 2, 24 y 48 h. (C) Control, biofilms no tratados; (T) Tratado.

Datos expresados como Log CFU/ml±DE para CP y como Log CFU/cm<sup>2</sup>±DE para las adhesiones sobre AI y MUF de resultados obtenidos por triplicado.

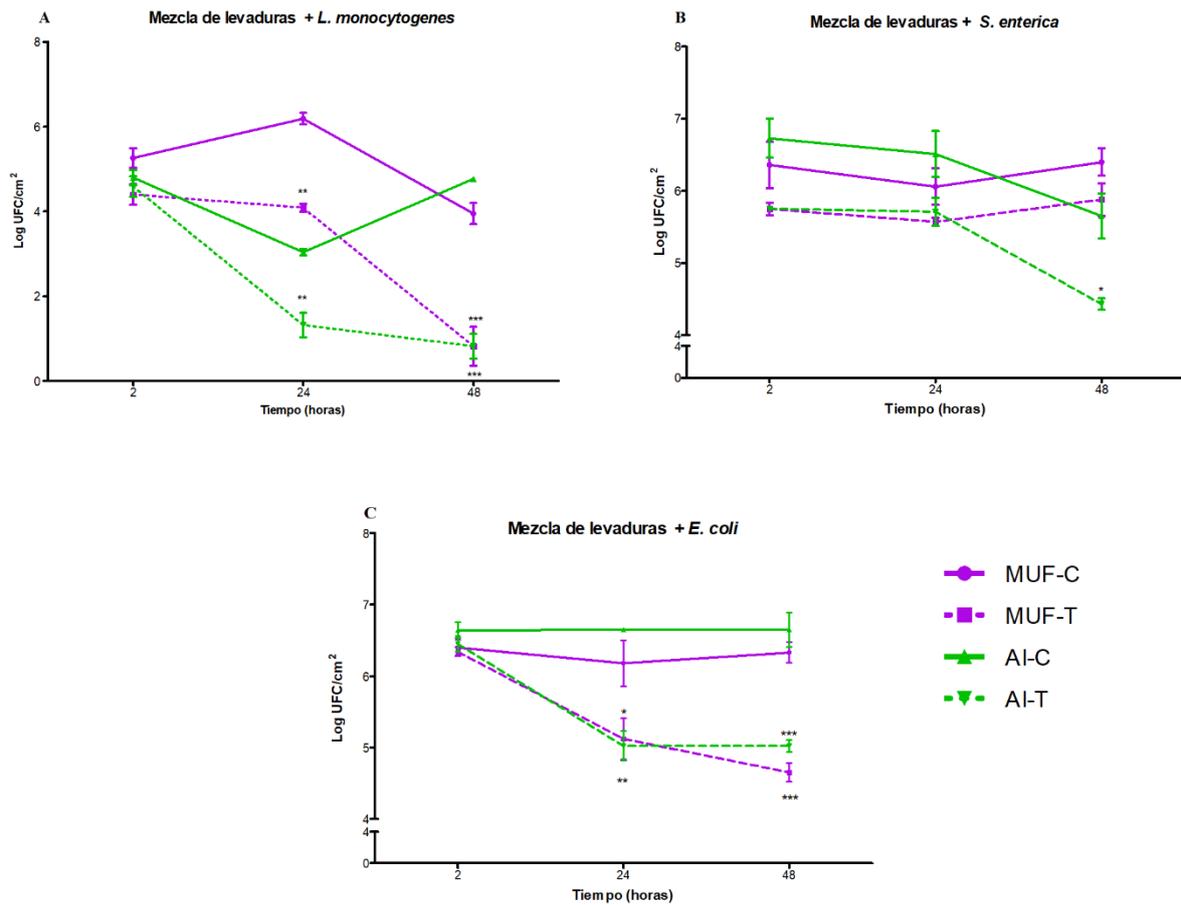
Uno dato relevante es que no se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los recuentos de levaduras tratadas al comparar la adhesión entre AI y MUF, y la presencia de bacterias patógenas no modificó ( $p > 0,05$ ) la susceptibilidad de la levadura a NAT+FAR: los recuentos de las cuatro levaduras se reducen notablemente (en promedio más de 2,7 unidades logarítmicas tras 48 h) por NAT+FAR, independientemente de las superficies y de la presencia de las bacterias patógenas evaluadas, de una forma dependiente del tiempo.



**Figura 51** Recuento diferencial en biofilms formados por la mezcla de levadura en (A) cultivos planctónicos y adheridos sobre (B) membrana de ultrafiltración y (C) acero inoxidable después de 2, 24 y 48 h. (C) Control, biofilm no tratado; (T) Tratado, biofilm con natamicina 0,01 mM + farnesol 0,6 mM.

Datos expresados como Log CFU/cm<sup>2</sup>, las barras representan el DE de resultados obtenidos por triplicado. Las diferencias significativas se expresan en referencia al control.

Tras analizar cada población bacteriana en biofilms multiespecie después de 24 y 48 h, los recuentos de *L. monocytogenes* (Figura 52, A) se redujeron notablemente ( $p < 0,001$ ) en MUF (2,10 y 3,13 log UFC/cm<sup>2</sup>) y AI (1,71 y 3,95 log UFC/cm<sup>2</sup>). En el caso de *S. enterica*, la reducción máxima fue de 1,22 unidades logarítmicas sobre AI después de 48 h, y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en las reducciones en MUF (Figura 52, B). La adhesión de *E. coli* se redujo significativamente ( $p < 0,001$ ), aprox. 1,65 unidades logarítmicas, después de 48 h en ambas superficies (Figura 52, C).



**Figura 52** Recuento celular de (A) *Listeria monocytogenes*, (B) *Salmonella enterica* y (C) *Escherichia coli* O157:H7 formando biofilms multiespecie con la mezcla de levaduras adheridas sobre membranas de ultrafiltración (MUF) y acero inoxidable (AI). (C) Control; (T) Biofilms tratados con natamicina 0,01 mM + farnesol 0,6 mM.

Datos expresados como Log CFU/cm<sup>2</sup>, las barras representan el DE. Las diferencias significativas se expresan en referencia al control.

Para una mejor comprensión de los efectos de NAT+FAR sobre las bacterias, se expuso la combinación NAT+FAR a los CP en jugo de manzana de las tres patógenas (**Tabla 18**). Al igual que lo observado en biofilms multiespecie, NAT+FAR produjo una disminución en la viabilidad celular de *L. monocytogenes*, su población decreció 1,96-1,74 unidades logarítmicas, en comparación con los controles después de 24 y 48 h, respectivamente. *S. enterica* y *E. coli* presentaron comportamientos diferentes en lo que respecta a los biofilms multiespecie, ya que no se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los controles y las células sometidas a NAT+FAR en los CP.

**Tabla 18** Células viables cultivables de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 en cultivo planctónico después de 24 y 48 h de tratamiento con natamicina 0,01 mM + farnesol 0,6 mM (NAT+FAR) en jugo de manzana. Los resultados se expresan como log UFC/ml  $\pm$  DE.

	T <sub>24</sub>		T <sub>48</sub>	
	Control	NAT+FAR	Control	NAT+FAR
<i>L. monocytogenes</i>	5,67 $\pm$ 0,75	3,71 $\pm$ 0,35**	4,35 $\pm$ 0,79	2,61 $\pm$ 0,01***
<i>S. enterica</i>	8,18 $\pm$ 0,01	8,07 $\pm$ 0,12 <sup>ns</sup>	8,23 $\pm$ 0,37	7,78 $\pm$ 0,31 <sup>ns</sup>
<i>E. coli</i>	7,96 $\pm$ 0,05	7,94 $\pm$ 0,18 <sup>ns</sup>	7,91 $\pm$ 0,05	7,72 $\pm$ 0,01 <sup>ns</sup>

Las diferencias significativas son en relación con el control vs. tratamiento.

Para explorar más a fondo los efectos sobre la morfología de los biofilms multiespecie, se obtuvieron imágenes de SEM para los biofilms sobre MUF (**Figura 53 A, B y C**) y microscopía de fluorescencia para los biofilms sobre AI (**Figura 53 A\*, B\* y C\***). Se seleccionaron los biofilms multiespecie formados con *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 para ser analizados como una representación de una bacteria grampositiva y gramnegativa, respectivamente. En la primera columna se presentan las imágenes del biofilm control, en el cual se aprecia una amplia colonización de las levaduras sobre las superficies. Se formaron multicapas de blastosporas (forma de levadura) y pseudohifas, y se unieron tanto al AI como a las fibras de MUF, incluso algunas están incrustadas en el interior de la MUF. En la segunda y tercera columna se muestra la inhibición de los biofilms por NAT+FAR de la mezcla de levaduras y los biofilms multiespecie en presencia de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. Las muestras sometidas a tratamiento presentan una notable disminución de la colonización por parte de las levaduras, con una predominancia de acúmulos celulares desorganizados y esparcidos sobre las superficies, con disrupción de EPS e interrupción del cambio morfológico de *C. tropicalis* (mayor presencia de células con formas esféricas). La modificación de la estructura tridimensional y el daño de las pseudohifas en las muestras tratadas fue tan significativa que permitió una visualización clara de las células de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 unidas a MUF (**Figura 53 3 B y 3 C**) y AI (**Figura 53 3 B\* y 3 C\***).



**Figura 53** Efecto de natamicina 0,01 mM + farnesol 0,6 mM en biofilms multiespecie, en membranas de ultrafiltración (MUF) y en acero inoxidable (AI) en jugo de manzana después de 48 h. Se obtuvieron imágenes SEM de MUF y MF de AI. (1) Control: biofilms no tratadas. (2 y 3) Natamicina y farnesol: biofilms tratados con natamicina + farnesol. (A, A\*) Biofilm de la mezcla de levadura formado por *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefir*. (B, B\*) Mezcla de levadura + *Listeria monocytogenes*; (C, C\*) Mezcla de levadura + *Escherichia coli* O157:H7. Los círculos indican restos de EPS, las flechas blancas indican las levaduras adheridas y las flechas azules señalizan bacterias. Magnificaciones 550 X (columnas 1 y 2) y 5.00 KX (columna 3) en SEM, y aumento 10X en microscopía de fluorescencia.

## DISCUSIÓN

### III.11 Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles

#### III.11.1 Identificación de COV en biofilms de *C. tropicalis*

El primer objetivo de este capítulo fue identificar los COV de *C. tropicalis* y cuantificar algunos de estos compuestos, mediante dos técnicas de concentración de metabolitos: extracción con solventes y HS/SPME, acoplado GC/MS. Se encontraron diferencias en cuanto a los COV detectados entre los métodos de extracción; los compuestos altamente polares, tales como los ácidos libres, solo se detectaron por extracción con disolvente, mientras que las moléculas que se detectaron por HS/SPME fueron alcoholes, ésteres y moléculas de baja polaridad (**Tabla 16**). En este método, las moléculas deben encontrarse en estado gaseoso para ser extraídas, y depende de las propiedades moleculares tales como el PM y la polaridad (Vas & Vékey, 2004). Se detectaron derivados de compuestos furfúricos en el jugo de manzana, los cuales se producen como resultado de determinadas transformaciones y condiciones de almacenamiento (Gökmen & Acar, 1999), lo que sugiere que estos compuestos no podrían haber sido biosintetizados por *C. tropicalis*. Los COV identificados en este estudio pueden compararse con los reportados por Martins et al. (2007) quienes detectaron alcohol isoamílico, 2-FE, nerolidol y FAR mediante la técnica de HS/SPME-GC/MS en *C. dubliniensis* y *C. albicans*. Los mismos autores revelaron que estos compuestos son excretados de manera continua por las células en estado planctónico y cuando están formando biofilms.

Un dato relevante que se desprende de esta investigación en cuanto a la identificación de COV es que los biofilms de *C. tropicalis* producen TIR, 2-FE y FAR bajo las condiciones evaluadas. Las tres moléculas han sido reportadas como MQS en otras especies de *Candida* y están asociadas con la modulación del desarrollo de biofilms (Johansen & Jespersen, 2017; Martins et al., 2007, 2010). Lingappa et al. (1969) propusieron que 2-FE y TIR actuaban como “autoinhibidores” en *C. albicans* y posteriormente, a TIR se lo identificó como MQS (Chen et al., 2004). FAR, es otra de las MQS liberada por *Candida*, la cual presenta efectos inhibitorios sobre la levadura (Alem et al., 2006; Martins et al., 2010; Monteiro et al., 2017; Weber et al., 2008). Autores como Grondin et al. (2015) detectaron que las moléculas más comunes en 26 especies de levaduras en YEPD eran 5 alcoholes (etanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol, 2-etilhexanol y 2-FE) y 3 ésteres (etanoato de 3-metil butilo, etanoato de 2-etilhexilo y 2-feniletil

etanoato), resaltando que el 2-FE se generó por las 26 especies. Por su parte, Fleischmann et al. (2017) identificaron la producción de FAR, TIR y triptol (no hallada en nuestro estudio) en *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. albicans*. Los investigadores cuantificaron los compuestos y observaron que la concentración de TIR era mayor que FAR en *C. krusei* y *C. glabrata*, mientras que *C. albicans* los produjo en cantidades similares. En un estudio reciente, se concluyó que *C. tropicalis*, predominante en un sistema de tratamiento de aguas residuales, produce diferentes MQS y concentraciones según el medio, sugiriendo que el tipo de matriz líquida afecta directamente la producción de estas moléculas (Zhang et al., 2022). Por ejemplo, FAR fue la molécula predominante detectada en un medio de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD), mientras que 2-FE predominó en un medio inductor de la filamentación. Al mismo tiempo, observaron que las concentraciones de FAR y 2-FE disminuían gradualmente con el paso del tiempo, en un sistema de depuración de aguas residuales, el cual contenía aceite. En los resultados de nuestro trabajo, también se evidenció una disminución de 2-FE y un incremento de TIR a medida que transcurrían los días de incubación (**Tabla 16**). Esto también podría indicar que, el tiempo de incubación de los biofilms desempeña un papel importante en la producción de estas moléculas en *Candida*. Tomando en cuenta los hallazgos de este estudio y lo reportado en la bibliografía, podemos concluir que las especies de *Candida*, entre ellas *C. tropicalis*, producen diversos COV, algunos de los cuales son MQS (FAR, 2-FE y TIR) y que su producción podría depender del tipo de matriz líquida, de la especie en cuestión y de las condiciones de cultivo como el tiempo de incubación.

### III.11.2 Identificación y cuantificación de COV en biofilms de levaduras en presencia de bacterias patógenas

Se está haciendo cada vez más evidente que las MQS, además de tener un papel relevante en la comunicación entre las levaduras, participan en las interacciones entre bacterias y las células eucariotas (Kim et al., 2021). Teniendo en cuenta que, el 2-FE fue uno de los compuestos más abundantes identificados en los biofilms de *C. tropicalis* (**Tabla 16**), y que en ciertas concentraciones (de 90 a 180 mM) ejerce una acción inhibitoria sobre bacterias grampositivas (Corre et al., 1990; Lilley & Brewer, 1953), se cuantificó su producción y se evaluó que sucedía ante la presencia de *L. monocytogenes*. Los resultados demostraron que, los biofilms monoespecie de *C. tropicalis* producen 2-FE en un rango variable, y que en los biofilms duales, *L. monocytogenes* no modifica la producción basal de 2-FE en *C. tropicalis* (**Tabla 17**). La concentración de 2-FE en biofilms de *C. tropicalis* se mantuvo en un rango de 15,75 mg/l (129

$\mu\text{M}$ ) a 51,92 mg/l (425  $\mu\text{M}$ ), el cual es superior al mínimo (0,6 mg/l) registrado por Zhang et al. (2022) en sobrenadantes de *C. tropicalis* aislada de aguas residuales, pero inferior al máximo (246 mg/l) tras 48 h de incubación. Por otro lado, Martins et al. (2007) reportaron que se produce una mayor cantidad de 2-FE en biofilms de *C. dubliniensis* (41,87  $\mu\text{mol/g}$ ) que en los biofilms de *C. albicans* (29,39  $\mu\text{mol/g}$ ). Aunque estos valores no se pueden comparar directamente con los resultados de este estudio debido a la metodología empleada, estos nos proporcionan información acerca de la variabilidad que existe entre especies en cuanto a la producción de 2-FE y también en cuanto a los métodos de cuantificación seleccionados. Por otra parte, analizando los biofilms duales, se podría suponer que el 2-FE no ejerce efecto antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* en las condiciones evaluadas, dado que la concentración detectada no es suficientemente alta para actuar como tal.

Siguiendo con el interrogante que, si la presencia de bacterias patógenas puede modificar la producción de COV de levaduras, se cuantificó la producción de estos en los sobrenadantes generados por biofilms multiespecie sobre MUF (**Figura 40**). Se detectó y cuantificó alcohol amílico en biofilms monoespecie de *C. tropicalis* y *C. krusei*, y en esta última se comprobó la presencia de acetato de etilo. Se encontraron ambos compuestos en los biofilms duales de las levaduras en presencia y ausencia de las bacterias patógenas, y no se apreciaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en su producción. Se ha informado que alcoholes como el propanol, el butanol, y el alcohol isoamílico, tienen una función inductora de la filamentación en *S. cerevisiae*, pero cumplen con una función de inhibición de la filamentación en *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Chen & Fink, 2006). El tipo de alcohol que se produce depende de la disponibilidad de aminoácidos como la leucina, isoleucina, valina y treonina, que pueden favorecer la producción de alcohol amílico, alcohol isoamílico, butanol y propanol, respectivamente (Dickinson, 2008; Lorenz et al., 2000). Se sabe que el acetato de etilo se produce por diferentes especies de levaduras como un compuesto aromático, que se forma debido a la fermentación de azúcares en pequeñas cantidades (Jolly et al., 2006; Löser et al., 2014; Willaert & Nedovic, 2006). Westall, (1998) analizó 169 cepas de levadura en cuanto a su capacidad para producir metabolitos volátiles durante el cultivo aeróbico. De los 70 volátiles identificados, dos tercios eran ésteres, y el acetato de etilo era a menudo el compuesto predominante formado por levaduras pertenecientes a *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichi* y otros géneros. En biofilms de *C. albicans* y *C. dubliniensis* se han informado concentraciones de 45,17  $\mu\text{mol/g}$  y 25,9  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente, tras 48 h; en ambos casos, los valores se incrementaron ligeramente con la maduración de los biofilms (Martins et al., 2007).

Al evaluar los resultados de esta sección de forma conjunta, se podría concluir que la presencia de bacterias no tiene un impacto significativo en la producción de los COV analizados. Los hallazgos de este estudio proporcionan nuevos conocimientos sobre los COV liberados en biofilms formados por levaduras y bacterias patógenas de relevancia para la industria productora de jugos de fruta.

### III.12 Estrategias de remoción de biofilms

El segundo objetivo de este capítulo fue evaluar nuevas estrategias de prevención y/o remoción de biofilms formados por levaduras en superficies de uso alimentario utilizando tres de los COV identificados, que también funcionan como MQS, solas o en combinación con el antifúngico NAT. Para ello, se evaluó en una primera etapa el efecto que tenía la adición exógena de TIR, 2-FE y FAR sobre biofilms formados por *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefir*, para luego seleccionar el compuesto que tuviera efectos sobre los biofilms y así combinarlo con NAT.

#### III.12.1 En biofilms de levaduras sobre AI

Los tratamientos con TIR, 2-FE y FAR mostraron un comportamiento distinto en el crecimiento de las levaduras tanto en biofilms monoespecie como en la mezcla. TIR no provocó efectos en los recuentos celulares ni en la morfología de las levaduras, aunque se sabe que acelera la formación del tubo germinativo y la conversión de las especies de *Candida* de la forma celular a la filamentosa (Chen et al., 2004). Por su parte, el efecto de 2-FE en los biofilms monoespecie de *C. tropicalis* varió en función del momento de su incorporación, independientemente de la concentración evaluada (0,05 a 1,2 mM). A diferencia de nuestros resultados, Lei et al. (2022) demostraron que el efecto de 2-FE dependía de la concentración; la adición de 2-FE ( $\geq 0,6$  mM) aumentaba ligeramente la adhesión de *Debaryomyces nepalensis*, y a menores concentraciones (0,05 - 0,4 mM) no se observaba ningún efecto sobre la formación de biofilms. Aunque la presencia de 2-FE no alteró el recuento total en la mezcla de levaduras, las imágenes de microscopía de fluorescencia (**Figura 44**) parecen revelar que 2-FE tiene como efecto principal el incremento de la densidad de los biofilms. Estos resultados pueden relacionarse con estudios previos, que demostraron que 2-FE estimula el crecimiento de pseudohifas en especies como *S. cerevisiae* y *D. hansenii* (Gori et al., 2011). De los tres compuestos evaluados, solo FAR presentó un efecto inhibitorio sobre los biofilms de las levaduras, actuando principalmente sobre *C. tropicalis*. FAR puede actuar como MQS

estimulando y/o inhibiendo la formación de biofilms, así como también puede actuar como un agente exógeno sobre las especies de *Candida*. Con relación a este último punto, la adición exógena de FAR en el medio de crecimiento puede tener un efecto negativo en el mecanismo QS, ya sea limitando la adhesión de las levaduras en las superficies, o creando un efecto tóxico sobre las vías metabólicas implicadas en la formación de biofilms (Yapıcı et al., 2021). En este sentido, se han propuesto una serie de respuestas fisiológicas; por un lado, FAR actúa acumulándose en el medio a medida que proliferan las células y en un determinado momento suprime la formación de tubos germinativos (Hornby et al., 2001; Oh et al., 2001; Rodrigues & Černáková, 2020). Por otro lado, FAR reduce la hidrofobicidad superficial e induce el estrés oxidativo y la posterior apoptosis (Krom et al., 2016). En este estudio, FAR inhibió la transición morfológica de las especies de *Candida*, mientras que *R. mucilaginosa* fue quien presentó menos susceptibilidad (**Figura 41, Figura 42, Figura 43**). Jarros et al. (2022) informaron que la adición de FAR 0,9 mM, concentración cercana a la evaluada en este estudio, no producía efectos en el recuento de los biofilms de *R. mucilaginosa*, pero que esta experimentaba una reducción significativa en su actividad metabólica y en la biomasa total de los biofilms cuando se exponían a FAR. Otros investigadores (Bezerra et al., 2020; Cordeiro et al., 2013; Ramage et al., 2002; Weber et al., 2008) demostraron que FAR inhibe la conversión de la forma de levadura a forma filamentosa más que la reducción celular en sí misma y que afecta la actividad metabólica. Esto concuerda con nuestros resultados, en los que se observó que la reducción en el recuento celular de las especies de *Candida* no fue superior a una unidad logarítmica. Por su parte, Monteiro et al. (2017) informaron una reducción en la viabilidad celular de *C. albicans* y *C. glabrata* al utilizar una concentración de FAR de 60 mM en biofilms, la cual es una concentración 100 veces mayor a la utilizada en el presente estudio. Las diferencias en los resultados podrían deberse a que las especies de *Candida* evaluadas en nuestro estudio son más sensibles al FAR, por lo que se requieren concentraciones menores para alcanzar los mismos valores de reducción.

Otro punto interesante para mencionar es que el efecto de FAR agregado puede depender del momento en el cual se adiciona. Anteriormente, se ha reportado que, si la transición de levaduras a hifas se produce antes del agregado del compuesto, no habrá ningún efecto regulador aparente (Henriques et al., 2007). Zhang et al. (2022) sustentaron esta idea y reportaron que, después de inducir la filamentación de *C. tropicalis* durante 24 h, las células de levadura se transformaron en micelio, y la suplementación con (E, E)-FAR no impidió el alargamiento continuo del micelio existente. En consecuencia, los autores proponen que la regulación de la transformación morfológica de las células de levadura a través de MQS debería

realizarse en las etapas iniciales del proceso de filamentación celular (0-24 h). Esto se observó no solo con FAR, sino también con 2-FE y TIR (Chen et al., 2004; Zhang et al., 2022).

Los estudios presentados hasta ahora (Bezerra et al., 2020; Cordeiro et al., 2013; Ramage et al., 2002), incluyendo este trabajo, proporcionan evidencias de que FAR impide el dimorfismo (cambio morfológico de levadura a una estructura filamentosa), la adhesión y/o la formación de biofilms en varias especies de levaduras, tales como *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Fusarium keratoplasticum* y *Trichosporon* spp.

FAR, además de ser un agente regulador por sí mismo, puede aumentar el efecto inhibitorio en combinación con otros agentes antifúngicos, como, por ejemplo, fluconazol, anfotericina B, micafungina (Bezerra et al., 2020; Fernández-Rivero et al., 2017; Katragkou et al., 2015). Por ejemplo, se ha evidenciado que altas concentraciones de FAR tienen un efecto aditivo en combinación con anfotericina B sobre los biofilms de *C. tropicalis* formados en PTFE (Fernández-Rivero et al., 2017), y, un efecto sinérgico con anfotericina B, fluconazol y micafungina sobre biofilms de *C. albicans* (Katragkou et al., 2015).

En esta tesis, el compuesto antifúngico que se combinó con FAR fue NAT. Como se ha señalado, NAT sola o en asociación con otros agentes antimicrobianos (nisina, quitosano, alginato) se presenta como una alternativa a los compuestos sintéticos para prolongar la vida útil de los productos alimenticios mediante la protección de sus propiedades fisicoquímicas y bioactivas (Duran et al., 2016; Karaman et al., 2020; Küçük et al., 2020; Ollé Resa et al., 2014; Santos et al., 2018). Al aplicar concentraciones de 0,3 a 1,2 mM de NAT, la viabilidad celular de los biofilms de *C. tropicalis* se redujo significativamente (**Figura 45**). El efecto de NAT fue dependiente del tiempo de exposición (2, 6, 24 y 48 h) y de la concentración evaluada, tal como se reporta en los estudios realizados sobre biofilms de *S. cerevisiae* (Gallo & Jagus, 2007). Al mezclar estas concentraciones con FAR, no se apreciaron cambios en los valores de reducción en el rango de concentraciones evaluadas. En contraste, la adición de FAR provocó un ligero incremento en el crecimiento de *C. tropicalis* durante las primeras 6 h de formación del biofilm (**Figura 45**). Esto puso de manifiesto que la capacidad de inhibición de FAR es claramente inferior a la demostrada por NAT. No obstante, la mayor concentración de NAT permitida en bebidas por la FDA es aprox. 0,01 mM (Lewis et al., 2015). Por este motivo, se redujo la concentración de NAT a 0,01 mM y se combinó con FAR 0,6 mM sobre biofilms monoespecie de levaduras sobre AI. En *C. tropicalis*, los efectos inhibitorios de FAR mejoraron el rendimiento de NAT (se muestra en la **Figura 46**) y causaron una evidente interrupción de la estructura del biofilm en comparación con las células tratadas solo con NAT 0,01 mM desde las primeras etapas (6 h) de formación (**Figura 47**). La combinación mejoró significativamente

los efectos inhibitorios de NAT en todos los tiempos de incubación, causando un efecto sinérgico a partir de las 6 h de incubación. Con NAT 0,01 mM + FAR 0,6 mM se observaron efectos similares a los obtenidos con NAT a 0,6 y 1,2 mM a las 24 y 48 h. Esto sugiere que la concentración de NAT podría reducirse cuando se combina con FAR sin que esto afecte la capacidad de NAT para inhibir a *C. tropicalis*. Al añadir FAR, la dosis de NAT se puede reducir 100 veces sin consecuencias adversas en la inhibición del biofilms. Aquí se puede ver el efecto máximo de la combinación, el cual se corresponde con una reducción de 5 unidades logarítmicas.

Según corresponde a NAT, algunas especies y algunas cepas dentro de una especie tienen baja sensibilidad natural, por ejemplo, para el género *Aspergillus* (Lalitha et al., 2008; Xu et al., 2009). En este sentido, se observó que, comparando entre las especies de *R. mucilaginosa*, *C. krusei* y *C. kefyri*, esta última presentó mayor susceptibilidad al exponerse a NAT+FAR. Después de décadas de exponer los alimentos a NAT, ni mohos ni levaduras fueron reportados como resistentes frente a este compuesto, lo cual es bastante notable en comparación con otros conservantes. En general, las levaduras son menos resistentes (concentración inhibitoria mínima -CIM- por debajo de 5 ppm) que los mohos (CIM por encima de 10 ppm) (Lule et al., 2015). Para *S. cerevisiae* se ha reportado una CIM de NAT de 1,8  $\mu\text{M}$ , para *C. krusei*, *C. albicans* y *C. parapsilosis* de 3,6  $\mu\text{M}$ , mientras que para *R. mucilaginosa* de 4,2  $\mu\text{M}$  (Streekstra et al., 2016). Las diferencias en cuanto a la susceptibilidad entre especies de levaduras podrían ser causadas por diferentes factores que incluyen la composición de la pared celular (por ej., permeabilidad), la membrana plasmática (por ej., proteínas resistentes a múltiples fármacos) (Chamilos & Kontoyiannis, 2005; Rotowa et al., 1990; Stern, 1978) a la presencia de proteínas protectoras (Blum et al., 2013) o probablemente se deba a una baja concentración o acceso deficiente al objetivo principal de la NAT en la membrana celular: el ergosterol (te Welscher et al., 2008; van Leeuwen et al., 2008).

Las predicciones sobre el modo de acción de los agentes antimicrobianos requieren investigaciones exhaustivas que incluyan sus interacciones con el entorno circundante (Hyldgaard et al., 2012). Estas interacciones tienen un impacto importante en la susceptibilidad y resistencia de los microorganismos, por lo que revelar qué tan susceptible podría ser un microorganismo en la compleja comunidad en la que están inmersos como en los biofilms se convierte en un desafío.

### III.12.2 Efecto de NAT+FAR sobre cultivos planctónicos y biofilms multiespecie sobre AI y MUF

Los resultados obtenidos en conjunto con trabajos anteriores han establecido claramente que FAR y NAT tienen un efecto relevante sobre las levaduras (Bezerra et al., 2020; Karaman et al., 2020; Ollé Resa et al., 2014; Xia et al., 2017); sin embargo, no se disponen de datos que exploren el efecto de su combinación contra biofilms multiespecie en superficies industriales de uso alimentario. El objetivo de esta sección fue evaluar la combinación NAT 0,01 mM + FAR 0,6 mM frente a cultivos multiespecie en su forma de células libres (CP) y en biofilms multiespecie.

A pesar de que existen informes en la literatura sobre la adhesión de microorganismos en MUF, la mayoría están circunscritos a los biofilms en los sistemas de aguas residuales (Cai & Zhang, 2013). En consecuencia, los resultados obtenidos aquí ofrecen una información útil sobre los biofilms que se desarrollaron en MUF utilizados en procesos de clarificación en la industria juguera.

Es bien sabido que los microorganismos en estado sésil presentan un fenotipo distinto del estado planctónico, con mayor resistencia frente a los antimicrobianos (Davies, 2003), y es difícil predecir qué tan susceptible es un microorganismo y por qué la susceptibilidad varía de una especie a otra, y de una condición a otra. Posterior al tratamiento con NAT+FAR, la reducción del recuento celular de la mezcla de levaduras en los CP (**Figura 49**) fue significativamente mayor que en las adheridas tras 24 h, pero no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la combinación multiespecie (**Figura 50**). En particular, en los biofilms, se observó inhibición de las formas filamentosas de las levaduras, alteración de la estructura tridimensional y un alto desprendimiento de células de levaduras, permitiendo que solo se observen células individuales adheridas a las superficies (**Figura 53**, tercera columna). Cabe destacar que el efecto de la combinación sobre las levaduras no se vio afectada por la presencia de *L. monocytogenes*, *S. enterica* o *E. coli* O157:H7; las levaduras fueron susceptibles en todos los tiempos analizados, independientemente de las especies bacterianas co-adheridas.

Hasta donde se tiene conocimiento, esta es la primera investigación que explora los efectos inhibitorios de NAT + FAR contra biofilms multiespecie en los que coexisten levaduras y bacterias; por ende, no es posible establecer una comparación directa entre este estudio y otros. NAT y FAR son reconocidos por su acción contra las levaduras, y no existen registros sobre la actividad antibacteriana de ambos compuestos combinados en patógenos bacterianos

transmitidos por los alimentos. Tras analizar el efecto de NAT+FAR sobre las bacterias, *L. monocytogenes* se vio afectada tanto en CP como en biofilms multiespecie. Por el contrario, la viabilidad celular de *E. coli* y *S. enterica* en CP no se modificó, pero sí se vio afectada en los biofilms multiespecie. Vale la pena mencionar que en este microhábitat, levaduras y bacterias interactúan entre sí, con la superficie y con la matriz alimentaria, tanto física como químicamente, y los microorganismos generan diferentes metabolitos que son esenciales para la regulación del crecimiento celular y la formación de biofilms (Khan et al., 2021). Los cambios generados en este microambiente podrían aumentar la hidrofobicidad de los compuestos similares a FAR ayudándolos a penetrar o a disolver la membrana celular (Burt, 2004; Yousefi et al., 2020). Teniendo esto en cuenta, una posible explicación a las diferencias observadas entre *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. enterica* en CP podrían deberse a la estructura de las capas externas de la envoltura celular (Breijyeh et al., 2020; Burt, 2004; Calo et al., 2015; Pietrysiak et al., 2019). Sin embargo, esto no aclara completamente el efecto de NAT+FAR sobre los patógenos bacterianos en biofilms multiespecie. A partir de la investigación actual, es posible plantear la hipótesis de que estos resultados son probablemente una consecuencia de la acción de NAT+FAR sobre las levaduras. La escisión del EPS, el desprendimiento de las levaduras y la falta de la estructura tridimensional podrían favorecer el desprendimiento y evitar la permanencia de los patógenos bacterianos en las superficies. Considerando todas las posibles explicaciones, se puede especular con un proceso multifactorial que involucra las interacciones fisicoquímicas entre las células, la superficie y la matriz alimentaria, junto con la inhibición del cambio morfológico de las levaduras, influyen negativamente en la supervivencia y la unión de *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli*. Esto sugiere la necesidad de nuevos estudios con más enfoque en el efecto de NAT+FAR en los patógenos transmitidos por los alimentos.

Los resultados sobre biofilms pueden estar asociados, en parte, con los que Lopes et al. (2021) reportaron al examinar la actividad antimicrobiana de FAR en concentraciones que oscilan entre 8,0 y 128 µg/ml contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Estos autores notificaron actividad antibacteriana en especies grampositivas, tales como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp., y se planteó que FAR era eficaz tanto para reducir la biomasa como para eliminar las bacterias en los biofilms, demostrando una notable afinidad de unión con proteínas específicas implicadas en la producción de biofilms. No obstante, los investigadores no lograron evidenciar la actividad antibacteriana de FAR contra especies gramnegativas en las concentraciones evaluadas. En cuanto a NAT, Mohamed et al. (2005) informaron un pequeño efecto inhibitor, aunque significativo, sobre el número de UFC

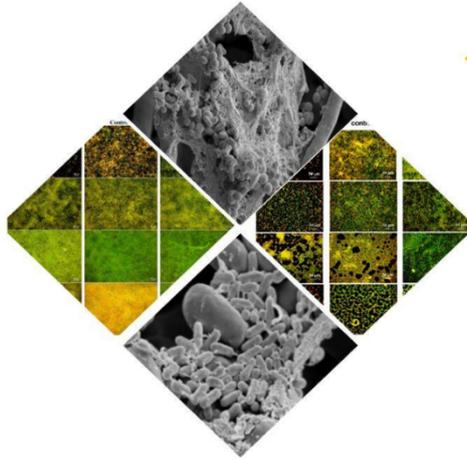
bacterianas aisladas del suelo, lo que demostró que se alteraba la estructura de la comunidad bacteriana en comparación con el control sin NAT. Conforme a eso, Shah et al. (2020) encontraron que diferentes concentraciones de NAT (5-1,00 y 1,50 g/l) redujeron el crecimiento de levaduras, bacterias aeróbicas y enterobacterias en el ensilaje de *Pennisetum híbrido*. Aunque no se ha confirmado el efecto inhibitorio de NAT sobre bacterias, se podría suponer que, si existe, el mecanismo de acción sería distinto al de las levaduras.

Retomando el segundo objetivo establecido al inicio de este estudio, es posible concluir que la susceptibilidad de las levaduras a NAT+FAR se mantuvo independientemente de las superficies utilizadas y las bacterias co-adheridas. La interrupción de la estructura tridimensional de los biofilms multiespecie en las superficies de AI y MUF por NAT+FAR en jugo de manzana es un hallazgo clave, dado que el uso de esta combinación sería ventajoso frente a otros agentes antimicrobianos que no penetran en la biopelícula debido al EPS que actúa como una barrera protectora. Al mismo tiempo, esta reducción tiene un impacto adverso en la persistencia y la adherencia de patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos en las condiciones estudiadas.

Parte de los resultados obtenidos en este capítulo han sido publicados:

“Application of natamycin and farnesol as bioprotection agents to inhibit biofilm formation of yeasts and foodborne bacterial pathogens in apple juice processing lines”. **Agustín, M.R**, Tarifa M.C., Vela-Gurovic, M.S., Brugnoli, L.I. (2023) *Food Microbiology*. DOI:10.1016/j.fm.2022.104123

“Effect of quorum sensing molecules and natamycin on biofilms of *Candida tropicalis* and other yeasts isolated from industrial juice filtration membranes”. **Agustín, M.R**, Viceconte F.R., Vela Gurovic M.S., Costantino A. and Brugnoli L.I. (2019). *Journal of Applied Microbiology*. DOI:10.1111/jam.14248.



# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los biofilms representan una fuente de contaminación de los alimentos causada por microorganismos patógenos y alterantes y han sido objeto de gran atención. Esta tesis se centró en evaluar los factores bióticos y abióticos que influyen en la formación y maduración de los biofilms, y en estudiar estrategias de biocontrol para su prevención y/o remoción.

Los resultados del **Capítulo I** brindan evidencias que la adhesión y formación de biofilms de *L. innocua* y *L. monocytogenes* dependen de factores que incluyen a la propia especie (hidrofobicidad, producción de curli y celulosa, agregación, capacidad de supervivencia y adhesión) y a factores externos (matriz alimentaria, pH, temperatura de incubación). Por otra parte, se evidenció que las levaduras asociadas al deterioro en la producción de jugos de frutas, como *R. mucilaginosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefir*, favorecen la adhesión y la supervivencia de bacterias patógenas alimentarias, como *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* O157:H7, en superficies de uso alimentario (AI y MUF).

Estas asociaciones bacterias-levaduras podrían contribuir a eventos de contaminación cruzada en ambientes alimentarios. Uno de los principales retos actuales es la necesidad de nuevas herramientas capaces de prevenir la formación de biofilms o remover los biofilms existentes de forma eficaz y así evitar la aparición de resistencias microbianas y la posible contaminación cruzada. Los procesos tradicionales de limpieza y desinfección utilizados presentan conocidas desventajas, como la toxicidad de los agentes de desinfección o la promoción de resistencia y/o tolerancia microbiana a los mismos. El uso de concentraciones inadecuadas de desinfectantes en la industria alimentaria es una de las principales causas de persistencia de patógenos sobre las superficies de producción y un problema de salud a nivel mundial, por lo que se justifica el estudio de nuevas estrategias de biocontrol mediante MQS y la evaluación de la eficacia de bacterias lácticas para el control de los microorganismos deteriorantes y patógenos causantes de ETA.

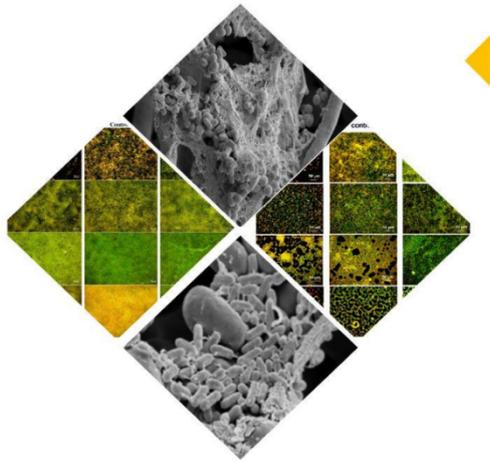
En este sentido, en el **Capítulo II** se analizó el empleo de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 y *Lb. casei* ATCC 393, para su posible aplicación como estrategias de biocontrol sobre bacterias patógenas de relevancia en la industria alimentaria. Nuestros resultados sugieren que estas BAL pueden considerarse buenas candidatas para controlar la adhesión y/o supervivencia de patógenos transmitidos por los alimentos en industrias relacionadas con la producción de jugo de manzana, principalmente cuando se adhieren previamente a las superficies en forma de biofilms protectores. El desarrollo de un biofilm protector con BAL podría dar una respuesta adicional a la necesidad de agentes antiadhesivos y antibiofilm alternativos que contribuyan a

mitigar, de manera ecológica, la insuficiente respuesta de los biofilms a los métodos de control convencionales en uso actual. Sin embargo, para confirmar la posible aplicación de estas especies como agentes de biocontrol se deben realizar análisis más detallados respecto a la alteración de las propiedades de los alimentos y también al modo de empleo en las condiciones de producción real.

Finalmente, en el **Capítulo III**, se identificaron los COV de biofilms de *C. tropicalis* adheridos a AI en jugo de manzana y los resultados demostraron que se liberan tres MQS, TIR, 2-FE y FAR. Además, la producción de COV depende de la especie a evaluar (en nuestro caso *C. tropicalis* y *C. krusei*) y de las condiciones del ambiente (tiempo, temperatura, matriz alimentaria). Al estudiar el empleo de TIR, 2-FE y FAR como agentes inhibidores, se observó que solo FAR inhibe a las levaduras cuando forman biofilms monoespecie y en la mezcla de levaduras. Se demostró también, la susceptibilidad de las levaduras ante la presencia de FAR combinado con el agente antifúngico NAT, y el efecto se mantuvo independientemente de las superficies alimentarias evaluadas (AI y MUF) y las bacterias co-adheridas. La interrupción de la estructura tridimensional de los biofilms multiespecie en superficies de membrana AI y MUF por NAT + FAR en jugo de manzana es un hallazgo clave, ya que el uso de esta combinación sería ventajoso sobre otros agentes antimicrobianos que no logran penetrar en la biopelícula debido a los compuestos liberados y a la propia matriz de EPS de los biofilms que actúan como una barrera protectora. Además, esta reducción probablemente tiene un impacto adverso en la persistencia y la adhesión de patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos en las condiciones estudiadas. La combinación de NAT + FAR podría usarse para diseñar conservantes y productos de limpieza a fin de prevenir la formación de biofilms en plantas de procesamiento de jugos. La aplicación de estos compuestos en líneas de procesamiento de jugo de manzana como métodos complementarios de higienización, permitiría el uso de concentraciones más bajas de agentes químicos comúnmente utilizados, como ácidos orgánicos e hipoclorito de sodio.

Las estrategias de prevención y remoción de los biofilms presentan múltiples desafíos, desde la identificación o el descubrimiento de nuevos antimicrobianos para su inclusión en nuevas formulaciones biocidas hasta el diseño de estrategias de descontaminación física eficaces para la inactivación de células, asociadas a biofilms en contacto con alimentos o el desarrollo de nuevos agentes de control biológico (Alvarez-Ordóñez et al., 2019). En base a nuestros resultados, se podría proponer un enfoque combinado: inhibición de la formación de biofilms por BAL + remoción de biofilms por compuestos antimicrobianos naturales. Es decir, las

superficies de uso de la industria alimentaria se podrían pre-acondicionar con BAL, para prevenir la adhesión de microorganismos causantes de ETA, y esto se podría combinar con NAT+FAR que actuarían, previniendo la proliferación de las levaduras sobre la superficie y modificando la estructura tridimensional de los biofilms.



# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- Ablin, L. A. (2011). El mercado del jugo concentrado de manzana. *Resumen Ejecutivo. Alimentos Argentinos*, MINCyT.
- Aguado, V., Vitas, A. I., & García-Jalón, I. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 341–347. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00313-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00313-1)
- Albuquerque, P., & Casadevall, A. (2012). Quorum sensing in fungi--a review. *Medical Mycology*, 50(4), 337–345. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., & Abadias, M. (2011). Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Microbiology*, 28(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.08.006>
- Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H., & Douglas, L. J. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1770–1779. <https://doi.org/10.1128/EC.00219-06>
- Almeida, E. T. da C., de Souza, G. T., de Sousa Guedes, J. P., Barbosa, I. M., de Sousa, C. P., Castellano, L. R. C., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2019). *Mentha piperita* L. essential oil inactivates spoilage yeasts in fruit juices through the perturbation of different physiological functions in yeast cells. *Food Microbiology*, 82, 20–29. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.01.023>
- Alonzo, G. A. (2013). Influences of simultaneous physicochemical stresses on injury and subsequent heat and acid resistances of *Salmonella* Enteritidis in apple juice. *Food Control*, 31(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.08.021>
- Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L. M., Briandet, R., & Cotter, P. D. (2019). Annual Review of Food Science and Technology Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 10, 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818>
- Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., Nieto, A. B., & Vidales, S. L. (2004). Manual de Capacitación: conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas (D. J. Mejía, Ed.). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [https://www.academia.edu/35894294/CONSERVACION\\_DE\\_FRUTAS\\_Y\\_HORTALIZAS\\_MEDIANTE\\_TECNOLOGIAS\\_COMBINADAS](https://www.academia.edu/35894294/CONSERVACION_DE_FRUTAS_Y_HORTALIZAS_MEDIANTE_TECNOLOGIAS_COMBINADAS)

- Amin, S. K., Hassan, M., & Abdallah, H. (2016). An Overview of Production and Development of Ceramic Membranes. *International Journal of Applied Engineering Research*, 11(12), 7708–7721.
- Anand, S., & Singh, D. (2013). Resistance of the constitutive microflora of biofilms formed on whey reverse-osmosis membranes to individual cleaning steps of a typical clean-in-place protocol. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6213–6222. <https://doi.org/10.3168/JDS.2013-7012>
- Angelo, K. M., Conrad, A. R., Saupe, A., Dragoo, H., West, N., Sorenson, A., Barnes, A., Doyle, M., Beal, J., Jackson, K. A., Stroika, S., Tarr, C., Kucerova, Z., Lance, S., Gould, L. H., Wise, M., & Jackson, B. R. (2017). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014–2015. *Epidemiology & Infection*, 145(5), 848–856. <https://doi.org/10.1017/S0950268816003083>
- Arena, M. P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00464>
- Arthey, D., & Ashurst, P. R. (1996). *Fruit Processing*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2103-7>
- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>
- Augusto, F., Carasek, E., Silva, R. G. C., Rivellino, S. R., Batista, A. D., & Martendal, E. (2010). New sorbents for extraction and microextraction techniques. *Journal of Chromatography*, A, 1217(16), 2533–2542. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2009.12.033>
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In S. Salminen & A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria* (3rd ed., pp. 1–66). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.CH1>
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C., & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries - Analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 239–250. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00067-9)

- Bai, A. J., & Rai, V. R. (2011). Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 10, Issue 3, pp. 183–193). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00150.x>
- Bamford, C. v., D’Mello, A., Nobbs, A. H., Dutton, L. C., Vickerman, M. M., & Jenkinson, H. F. (2009). *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infection and Immunity*, 77(9), 3696–3704. <https://doi.org/10.1128/IAI.00438-09>
- Bandara, H. M. H. N., Lam, O. L. T., Jin, L. J., & Samaranayake, L. (2012). Microbial chemical signaling: a current perspective. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(3), 217–249. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.652065>
- Bas, S., Kramer, M., & Stopar, D. (2017). Biofilm surface density determines biocide effectiveness. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 2443. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02443>
- Berk, Z. (2013). Chemical Preservation. *Food Process Engineering and Technology*, 591–606. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415923-5.00025-3>
- Beuchat, L. R. (1992). Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. *International Journal of Food Microbiology*, 17(2), 145–158. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90112-G](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90112-G)
- Bevilacqua, M., & Storti, L. (2011). Complejo Frutícola: Manzana y Pera Serie “Producción Regional por Complejos Productivos” MECON. In *Ministerio de Economía y Finanzas Públicas (MECON)*. Secretaría de Política Económica Subsecretaría de Programación Económica.
- Bezerra, C. F., de Alencar Júnior, J. G., de Lima Honorato, R., dos Santos, A. T. L., Pereira da Silva, J. C., Gusmão da Silva, T., Leal, A. L. A. B., Rocha, J. E., de Freitas, T. S., Tavares Vieira, T. A., Bezerra, M. C. F., Sales, D. L., Kerntopf, M. R., de Araujo Delmondes, G., Filho, J. M. B., Peixoto, L. R., Pinheiro, A. P., Ribeiro-Filho, J., Coutinho, H. D. M., ... Gonçalves da Silva, T. (2020). Antifungal activity of farnesol incorporated in liposomes and associated with fluconazole. *Chemistry and Physics of Lipids*, 233. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104987>
- Bhattacharjee, C., Saxena, V. K., & Dutta, S. (2017). Fruit juice processing using membrane technology: A review. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 43, pp. 136–153). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.002>

- Bibiloni, R., Pérez, P. F., Garrote, G. L., Disalvo, E. A., & de Antoni, G. L. (2001). Surface characterization and adhesive properties of bifidobacteria. *Methods in Enzymology*, 336, 411–427. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)36605-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)36605-3)
- Blackman, I. C., & Frank, J. F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a Biofilm on Various Food-Processing Surfaces. *Journal of Food Protection*, 59(8), 827–831. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.8.827>
- Blel, W., Bénézech, T., Legentilhomme, P., Legrand, J., & le Gentil-Lelièvre, C. (2007). Effect of flow arrangement on the removal of *Bacillus* spores from stainless steel equipment surfaces during a Cleaning In Place procedure. *Chemical Engineering Science*, 62(14), 3798–3808. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2007.04.011>
- Blum, G., Kainzner, B., Grif, K., Dietrich, H., Zelger, B., Sonnweber, T., & Lass-Flörl, C. (2013). In vitro and in vivo role of heat shock protein 90 in Amphotericin B resistance of *Aspergillus terreus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(1), 50–55. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2012.03848.X>
- Bohinc, K., Dražić, G., Fink, R., Oder, M., Jevšnik, M., Nipič, D., Godič-Torkar, K., & Raspor, P. (2014). Available surface dictates microbial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 50, 265–272. <https://doi.org/10.1016/J.IJADHADH.2014.01.027>
- Borovec, S., Broumis, C., Adcock, W., Fang, R., & Uren, E. (1998). Inactivation kinetics of model and relevant blood-borne viruses by treatment with sodium hydroxide and heat. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 26(3), 237–244. <https://doi.org/10.1006/BIOL.1998.0146>
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336–7342. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7336-7342.2003>
- Boudarel, H., Mathias, J. D., Blaysat, B., & Grédiac, M. (2018). Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *Npj Biofilms and Microbiomes* 2018 4:1, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0062-5>
- Bozó, A., Domán, M., Majoros, L., Kardos, G., Varga, I., & Kovács, R. (2016). The in vitro and in vivo efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 54(11), 753–760. <https://doi.org/10.1007/S12275-016-6298-Y>

- Brackett, R. E. (1994). Microbiological Spoilage and Pathogens in Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. *Minimally Processed Refrigerated Fruits & Vegetables*, 269–312. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2393-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2393-2_7)
- Brand, A., Barnes, J. D., Mackenzie, K. S., Odds, F. C., & Gow, N. A. R. (2008). Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 287(1), 48. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2008.01301.X>
- Braun, P. C., & Calderone, R. A. (1978). Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms. *Journal of Bacteriology*, 133(3), 1472–1477. <https://doi.org/10.1128/JB.133.3.1472-1477.1978>
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), 320–330. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
- Brejyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Bremer, P., Flint, S., Brooks, J., & Palmer, J. (2015). Introduction to Biofilms. *Biofilms in the Dairy Industry*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/9781118876282.CHI>
- Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., & Bellon-Fontaine, M. N. (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5328–5333. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5328-5333.1999>
- Brugnoni, L. I., Cubitto, M. A., & Lozano, J. E. (2011). Role of shear stress on biofilm formation of *Candida krusei* in a rotating disk system. *Journal of Food Engineering*, 102(3), 266–271. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2010.08.029>
- Brugnoni, L. I., Cubitto, M. A., & Lozano, J. E. (2012). *Candida krusei* development on turbulent flow regimes: Biofilm formation and efficiency of cleaning and disinfection program. *Journal of Food Engineering*, 111(4), 546–552. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2012.03.023>
- Brugnoni, L. I., Lozano, J. E., & Cubitto, M. A. (2007). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International*, 40(3), 332–340. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2006.10.003>

- Buchbauer, G., & Ilic, A. (2013). Biological Activities of Selected Mono- and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, 4109–4159. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_183](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_183)
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.03.022>
- Cai, L., & Zhang, T. (2013). Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. *Environmental Science and Technology*, 47(10), 5433–5441. <https://doi.org/10.1021/es400275r>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O’Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54, 111–119. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2014.12.040>
- Camargo, A. C., Todorov, S. D., Chihib, N. E., Drider, D., & Nero, L. A. (2018). Lactic Acid Bacteria (LAB) and Their Bacteriocins as Alternative Biotechnological Tools to Control *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities. In *Molecular Biotechnology*, 60 (9), 712–726. Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0108-1>
- Canzi, E., Guglielmetti, S., Mora, D., Tamagnini, I., & Parini, C. (2005). Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 88(3–4), 207–219. <https://doi.org/10.1007/S10482-005-6501-3>
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.01.005>
- Carpentier, B., & Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.031>
- Cassano, A., Donato, L., & Drioli, E. (2007). Ultrafiltration of kiwifruit juice: Operating parameters, juice quality and membrane fouling. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 613–621. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2006.02.020>
- Castellano, P. H., Holzapfel, W. H., & Vignolo, G. M. (2004). The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain

- Lactobacillus casei* CRL705. *Food Microbiology*, 21(3), 291–298. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2003.08.007>
- Castellano, P., Ibarreche, M. P., Massani, M. B., Fontana, C., & Vignolo, G. M. (2017). Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: A focus on meat ecosystems and industrial environments. *Microorganisms*, 5(3), 38 <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030038>
- Castillo, M., Puig, D., & Barceló, D. (1997). Determination of priority phenolic compounds in water and industrial effluents by polymeric liquid-solid extraction cartridges using automated sample preparation with extraction columns and liquid chromatography. Use of liquid-solid extraction cartridges for stabilization of phenols. *Journal of Chromatography A*, 778(1–2), 301–311. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00313-0)
- Cattelan, N., Yantorno, O., & Deora, R. (2018). Structural Analysis of *Bordetella pertussis* Biofilms by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Bio-Protocol*, 8(15). <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.2953>
- CDC. (2012, August 27). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado* | *Listeria* | CDC. Centers for Disease Control (CDC) and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>
- CDC. (2015). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Blue Bell Creameries Products* | *Listeria* | CDC. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html>
- CDC. (2017, June 28). *Listeria (Listeriosis)* | *Listeria* | CDC. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/index.html>
- Cetin-Karaca, H. (2011). Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens [Master, University of Kentucky]. In *University of Kentucky Master's Theses*. [https://uknowledge.uky.edu/gradschool\\_theses/652](https://uknowledge.uky.edu/gradschool_theses/652)
- Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., & Martínez, J. P. (1998). Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression.

- Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 130.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.130-180.1998>
- Chamilos, G., & Kontoyiannis, D. P. (2005). Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resistance Updates*, 8(6), 344–358.  
<https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2006.01.001>
- Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41(5), 539–543. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2008.03.003>
- Chang, S. sen, & Kang, D. H. (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(2), 55–74. <https://doi.org/10.1080/10408410490435089>
- Chang, Y. W., Fragkopoulos, A. A., Marquez, S. M., Kim, H. D., Angelini, T. E., & Fernández-Nieves, A. (2015). Biofilm formation in geometries with different surface curvature and oxygen availability. *New Journal of Physics*, 17(3), 033017. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/17/3/033017>
- Characklis, W. G., McFeters, G. A., & Marshall, K. C. (1990). *Physiological ecology in biofilm systems* - NLM Catalog - NCBI. John Wiley & Sons.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/100932420>
- Chaudhry, W. N., Concepcion-Acevedo, J., Park, T., Andleeb, S., Bull, J. J., & Levin, B. R. (2017). Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PloS One*, 12(1).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0168615>
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 728–737. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.728-737.2002>
- Chen, B., Sun, K., & Ren, T. (2005). Mechanical and viscoelastic properties of chitin fiber reinforced poly( $\epsilon$ -caprolactone). *European Polymer Journal*, 41(3), 453–457.  
<https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2004.10.015>
- Chen, H., & Fink, G. R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development*, 20(9), 1150. <https://doi.org/10.1101/GAD.1411806>
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., & Fink, G. R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 101(14), 5048–5052.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0401416101>
- Chen, L., Gu, Q., Li, P., Li, Y., Song, D., & Yang, J. (2018). Purification and Characterization of *Plantaricin* ZJ316, a novel bacteriocin against *Listeria monocytogenes* from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *Journal of Food Protection*, 81(12), 1929–1935.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-306>
- Chen, Y., Burall, L. S., Luo, Y., Timme, R., Melka, D., Muruvanda, T., Payne, J., Wang, C., Kastanis, G., Maounounen-Laasri, A., de Jesus, A. J., Curry, P. E., Stones, R., K'Aluoch, O., Liu, E., Salter, M., Hammack, T. S., Evans, P. S., Parish, M., ... Brown, E. W. (2016). *Listeria monocytogenes* in stone fruits linked to a multistate outbreak: Enumeration of cells and whole-genome sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7030–7040. <https://doi.org/10.1128/AEM.01486-16>
- Cheng, H. Y., Yu, R. C., & Chou, C. C. (2003). Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. *Food Research International*, 36(1), 49–56. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00107-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00107-2)
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22–32. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2003.TB00012.X>
- Chylkova, T., Cadena, M., Ferreiro, A., & Pitesky, M. (2017). Susceptibility of *Salmonella* Biofilm and Planktonic Bacteria to Common Disinfectant Agents Used in Poultry Processing. *Journal of Food Protection*, 80(7), 1072–1079. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-393>
- Codex Alimentarius. (2007). Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes*. Organización de las Naciones Unidas para los Alimentos y la Agricultura. 1–30. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/es/>
- Código Alimentario Argentino. (2010). *Capítulo XVIII Aditivos Alimentarios*. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- Cogan, N. G., Cortez, R., & Fauci, L. (2005). Modeling physiological resistance in bacterial biofilms. *Bulletin of Mathematical Biology*, 67(4), 831–853.  
<https://doi.org/10.1016/j.bulm.2004.11.001>

- Colagiorgi, A., di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2016). A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. *Microorganisms 2016*, Vol. 4, Page 22, 4(3), 22. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS4030022>
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, 5(40), 629–636. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2006.11.007>
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/S00217-007-0632>
- Corcoran, M., Morris, D., de Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., & Cormican, M. (2014). Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1507–1514. <https://doi.org/10.1128/AEM.03109-13>
- Cordeiro, R. A., Teixeira, C. E. C., Brilhante, R. S. N., Castelo-Branco, D. S. C. M., Alencar, L. P., de Oliveira, J. S., Monteiro, A. J., Bandeira, T. J. P. G., Sidrim, J. J. C., Moreira, J. L. B., & Rocha, M. F. G. (2015). Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Research*, 15(4), 12. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOV012>
- Cordeiro, R. A., Teixeira, C. E. C., Brilhante, R. S. N., Castelo-Branco, D. S. C. M., Paiva, M. A. N., Giffoni Leite, J. J., Lima, D. T., Monteiro, A. J., Sidrim, J. J. C., & Rocha, M. F. G. (2013). Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. *Medical Mycology*, 51(1), 53–59. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.692489>
- Corre, J., Lucchini, J. J., Mercier, G. M., & Cremieux, A. (1990). Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. *Research in Microbiology*, 141(4), 483–497. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(90\)90074-Z](https://doi.org/10.1016/0923-2508(90)90074-Z)
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41, 435–464. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.41.100187.002251>
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86–95. <https://doi.org/10.1038/SCIENTIFICAMERICAN0178-86>
- Cotter, P. D., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2000). Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F0F1 -ATPase operon in the acid tolerance response. *International Journal*

- of Food Microbiology*, 60(2–3), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00305-6)
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1641. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01641>
- da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & Oliveira, R. P. de S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 64, 527–536. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.07.041>
- Dalhoff, A. (2017). For Debate: May the Use of the Polyene Macrolide Natamycin as a Food Additive Foster Emergence of Polyene-Resistance in *Candida* Species? *Clinical Microbiology: Open Access*, 6(4), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000287>
- Darsonval, M., Grégoire, M., Deschamps, J., & Briandet, R. (2021). Confocal laser microscopy analysis of *Listeria monocytogenes* biofilms and spatially organized communities. *Methods in Molecular Biology*, 2220, 123–136. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0982-8\\_10/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0982-8_10/COVER)
- Das, T., Sharma, P. K., Krom, B. P., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2011). Role of eDNA on the adhesion forces between streptococcus mutans and substratum surfaces: Influence of ionic strength and substratum hydrophobicity. *Langmuir*, 27(16), 10113–10118. <https://doi.org/10.1021/LA202013M>
- Davey, M. E., & O’toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- de Sordi, L., & Mühlischlegel, F. A. (2009). Quorum sensing and fungal–bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS Yeast Research*, 9(7), 990–999. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2009.00573.X>
- de Vos, W. M. (2015). Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 1(1), 1–3. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.5>
- del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6), 438–442. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2000.00845.X>

- Deng, Q., Shi, H., Luo, Y., Zhao, H., & Liu, N. (2020). Effect of dietary *Lactobacilli* mixture on *Listeria monocytogenes* infection and virulence property in broilers. *Poultry Science*, 99(7), 3655–3662. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2020.03.058>
- Derengowski, L. S., De-Souza-Silva, C., Braz, S. v., Mello-De-Sousa, T. M., B ao, S. N., Kyaw, C. M., & Silva-Pereira, I. (2009). Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-13>
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Hervé, V., Labb e, J., Lastovetsky, O. A., Mieszkin, S., Millet, L. J., Vajna, B., Junier, P., Bonfante, P., Krom, B. P., Olsson, S., van Elsas, J. D., & Wick, L. Y. (2018). Bacterial-fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges. In *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 335–352. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy008>
- Deveau, A., & Hogan, D. A. (2011). Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 692, 219–233. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-971-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-971-0_16)
- di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., & Ianieri, 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), 1552–1561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>
- Dickinson, J. R. (2008). Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Folia Microbiologica*, 53(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/S12223-008-0001-6>
- Di ova, S., & Bujdakova, H. (2017). Properties and role of the quorum sensing molecule Farnesol in relation to the yeast *Candida albicans*. *Pharmazie*, 72(6), 307–312. <https://doi.org/10.1691/PH.2017.6174>
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2950–2958. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002>
- Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. v., Kalorey, D. R., Kurkure, N. v., Rawool, D. B., & Chakraborty, T. (2015). Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. *PLOS ONE*, 10(9), e0137046. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0137046>

- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/EID0809.020063>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Doyle, M. P., Glass, K. A., Beery, J. T., Garcia, G. A., Pollard, D. J., & Schultz, R. D. (1987). Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7), 1433. <https://doi.org/10.1128/AEM.53.7.1433-1438.1987>
- Duran, M., Aday, M. S., Zorba, N. N. D., Temizkan, R., Büyükcan, M. B., & Caner, C. (2016). Potential of antimicrobial active packaging “containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating” to extend shelf life of fresh strawberry. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.01.007>
- Eisert, R., & Levsen, K. (1996a). Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: A new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A*, 733(1–2), 143–157. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00875-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00875-6)
- Eisert, R., & Levsen, K. (1996b). Development of a prototype system for quasi-continuous analysis of organic contaminants in surface or sewage water based on in-line coupling of solid-phase microextraction to gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 737(1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01342-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01342-3)
- El-Diasty, E. M., El-Kaseh, R. M., & Salem, R. M. (2009). The effect of natamycin on keeping quality and organoleptic characters of yoghurt. *Arab Journal of Biotechnology*, 12(1), 41–48.
- Erkmen, O. (2000). Effect of carbon dioxide pressure on *Listeria monocytogenes* in physiological saline and foods. *Food Microbiology*, 17(6), 589–596. <https://doi.org/10.1006/FMIC.2000.0361>
- Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R., & Langsruda, S. (2017). Cleaning and Disinfection of Biofilms Composed of *Listeria monocytogenes* and Background Microbiota from Meat Processing Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17). <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-17>
- Fakhry, S. S., Rashid, F. A., Khudiar, M. M., Ismail, L. A., Ismail, S. K., & Kazem, R. J. (2021). Characterization of lactobacillus species proposed as probiotics. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 15, 143–150. <https://doi.org/10.5219/1479>

- Falagas, M. E., & Makris, G. C. (2009). Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *The Journal of Hospital Infection*, 71(4), 301–306. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2008.12.008>
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), 476–511. <https://doi.org/10.1128/MR.55.3.476-511.1991>
- FDA. (2004). *Guidance for Industry: Juice Hazard Analysis Critical Control Point Hazards and Controls Guidance, First Edition* | FDA. U.S. Food & Drug Administration. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-juice-hazard-analysis-critical-control-point-hazards-and-controls-guidance-first>
- FDA. (2021, November 29). *Code of Federal Regulations-Title 21*. U.S. Food & Drug Administration. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=117.3>
- Fernández Rivero, M. E. (2017). Estudio de la formación de la biopelícula de *Candida spp.* y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas. Universidad de Navarra.
- Fernandez-Alba, A. R., Agüera, A., Contreras, M., Peñuela, G., Ferrer, I., & Barceló, D. (1998). Comparison of various sample handling and analytical procedures for the monitoring of pesticides and metabolites in ground waters. *Journal of Chromatography. A*, 823(1–2), 35–47. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00439-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00439-7)
- Fernández-Rivero, M. E., del Pozo, J. L., Valentín, A., Molina De Diego, A., Pemán, J., & Cantón, E. (2017). Activity of Amphotericin B and Anidulafungin Combined with Rifampicin, Clarithromycin, Ethylenediaminetetraacetic Acid, N-Acetylcysteine, and Farnesol against *Candida tropicalis* Biofilms. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 3(1), 16. <https://doi.org/10.3390/jof3010016>
- Figueroa-González, I., Quijano, G., Ramírez, G., & Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics—perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1341–1348. <https://doi.org/10.1002/JSFA.4367>
- Filippou, O., Bitas, D., & Samanidou, V. (2017). Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1043, 44–62. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2016.08.040>
- Fleischmann, J., Broeckling, C. D., & Lyons, S. (2017). *Candida krusei* form mycelia along agar surfaces towards each other and other *Candida* species. *BMC Microbiology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0972-z>

- Flemming, H. C. (1997). Reverse osmosis membrane biofouling. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14(4), 382–391. [https://doi.org/10.1016/S0894-1777\(96\)00140-9](https://doi.org/10.1016/S0894-1777(96)00140-9)
- Flemming, H. C., & Ridgway, H. (2009). Biofilm Control: Conventional and Alternative Approaches. *Marine and Industrial Biofouling*, 103–117. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-69796-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-540-69796-1_5)
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. In *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Folsom, J. P., & Frank, J. F. (2006). Chlorine Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms and Relationship to Subtype, Cell Density, and Planktonic Cell Chlorine Resistance. *Journal of Food Protection*, 69(6), 1292–1296. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.6.1292>
- Fourie, R., Ells, R., Swart, C. W., Sebolai, O. M., Albertyn, J., & Pohl, C. H. (2016). *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interaction, with focus on the role of eicosanoids. *Frontiers in Physiology*, 7(FEB), 64. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2016.00064>
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. In *Trends in Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
- Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1345–1353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02559.x>
- Gallo, L. I., & Jagus, R. J. (2007). Modelling *Saccharomyces cerevisiae* Inactivation by Natamycin in Liquid Cheese Whey. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9, 311–316.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., & Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 142–148. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2010.01.005>
- Gálvez, A., López, R. L., Pulido, R. P., & Burgos, M. J. G. (2014). Natural Antimicrobials for Food Biopreservation. 3–14. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2029-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2029-7_2)
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.07.008>

- Ganegama Arachchi, G. J., Cridge, A. G., Dias-Wanigasekera, B. M., Cruz, C. D., McIntyre, L., Liu, R., Flint, S. H., & Mutukumira, A. N. (2013). Effectiveness of phages in the decontamination of *Listeria monocytogenes* adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(10), 1105–1116. <https://doi.org/10.1007/S10295-013-1313-3>
- Gao, H., & Liu, C. (2014). Biochemical and morphological alteration of *Listeria monocytogenes* under environmental stress caused by chloramine-T and sodium hypochlorite. *Food Control*, 46, 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.016>
- Garavaglia, J., Pinto, L. M. N., de SOUZA, D., de CASTILHOS, J., Rossi, R. C., Machado, I. C. K., Ramos, R. C. de S., & Ziegler, D. D. R. (2019). Natamycin and nisin to improve shelf life and minimize benzene generation in lemon soft drinks. *Food Science and Technology*, 39(2), 274–279. <https://doi.org/10.1590/FST.13217>
- García-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., P. Gómez de Cadiñanos, L., Requena, T., Peláez, C., & Martínez-Cuesta, M. C. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 57, 44–50. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.01.010>
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. In *Progress in Natural Science*, 18 (9). <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. In *Aquaculture*, 180. [www.elsevier.nl/locate/aqua-online](http://www.elsevier.nl/locate/aqua-online)
- Gaul, L. K., Farag, N. H., Shim, T., Kingsley, M. A., Silk, B. J., & Hyytia-Trees, E. (2013). Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery—Texas, 2010. *Clinical Infectious Diseases*, 56(1), 20–26. <https://doi.org/10.1093/CID/CIS817>
- Ghosh, A. M., Balakrishnan, M., Dua, M., & Bhagat, J. J. (2000). Ultrafiltration of sugarcane juice with spiral wound modules: on-site pilot trials. *Journal of Membrane Science*, 174(2), 205–216. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)00393-8)
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G. J., Kacániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., & Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6(7), 841. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00841/BIBTEX>
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S., & Nychas, G. J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of

- bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3), 298–309. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2013.05.023>
- Giordano, I., & Mauriello, G. (2023). Ultrasound attenuation improves some surface properties of the probiotic strain *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393. *Microorganisms*, 11(1), 142. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11010142>
- Giovannacci, I., Ermel, G., Salvat, G., Vendevre, J. L., & Bellon-Fontaine, M. N. (2000). Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 88(6), 992–1000. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2000.01057.X>
- Girón, J. A., Torres, A. G., Freer, E., & Kaper, J. B. (2002). The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 44(2), 361–379. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2002.02899.X>
- Glass, K. A., Golden, M. C., Wanless, B. J., Bedale, W., & Czuprynski, C. (2015). Growth of *Listeria monocytogenes* within a caramel-coated apple microenvironment. *MBio*, 6(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01232-15>
- Gökmen, V., & Acar, J. (1999). Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, 847(1–2), 69–74. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00133-8)
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M. P., Quecan, B. X. V., & de Melo Franco, B. D. G. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7(6). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00863>
- Gori, K., Knudsen, P. B., Nielsen, K. F., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2011). Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 11(8), 643–652. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2011.00755.X>
- Gorski, L., Palumbo, J. D., & Mandrell, R. E. (2003). Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 258–266. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.258-266.2003>
- Goulet, V., Jacquet, C., Martin, P., Vaillant, V., Laurent, E., & Valk, H. de. (2006). La surveillance de la listériose humaine en France, 2001-2003. *Eurosurveillance*, 11(6), 3–4. <https://doi.org/10.2807/ESM.11.06.00629-FR>

- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gyomai, P., & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(10), 1165–1171. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2006.06.014>
- Greco, W., Unkelbach, H. D., Pösch, G., Sühnel, J., Kundi, M., & Bödeker, W. (1992). Consensus on concepts and terminology for combined-action assessment: the Saariselkä agreement. *Arch Complex Environ Stud*, 4(3), 65–69.
- Grondin, E., Shum Cheong Sing, A., Caro, Y., Raheirandimby, M., Randrianierenana, A. L., James, S., Nueno-Palop, C., François, J. M., & Petit, T. (2015). A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.032>
- Guenther, A. (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysical Research*, 100(D5), 8873–8892. <https://doi.org/10.1029/94JD02950>
- Guerrieri, E., de Niederhäusern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I., & Bondi, M. (2009). Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*, 20(9), 861–865. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2008.11.001>
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., & Briandet, R. (2015). Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1813–1819. <https://doi.org/10.1128/AEM.03173-14>
- Guo, W., Ngo, H. H., & Li, J. (2012). A mini-review on membrane fouling. *Bioresource Technology*, 122, 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.04.089>
- Gupta, A. K., & Foley, K. A. (2019). Evidence for biofilms in onychomycosis. *Giornale Italiano Di Dermatologia e Venereologia: Organo Ufficiale, Societa Italiana Di Dermatologia e Sifilografia*, 154(1), 50–55. <https://doi.org/10.23736/S0392-0488.18.06001-7>
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7(6). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00825>

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 228–233. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00318-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00318-X)
- Haraguchi, Y., Goto, M., Kuda, T., Fukunaga, M., Shikano, A., Takahashi, H., & Kimura, B. (2019). Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* Tennozu-SU2 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BF1 on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* during and post fermentation of soymilk. *LWT*, 102, 379–384. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.12.042>
- Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380–392. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2006.06.006>
- Hascoët, A. S., Ripolles-avila, C., Cervantes-huamán, B. R. H., & Rodríguez-jerez, J. J. (2021). In Vitro Preformed Biofilms of *Bacillus safensis* Inhibit the Adhesion and Subsequent Development of *Listeria monocytogenes* on Stainless-Steel Surfaces. *Biomolecules*, 11(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/BIOM11030475>
- He, Y., Ji, Z., & Li, S. (2007). Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment. *Separation and Purification Technology*, 2(57), 366–373. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2007.04.025>
- Helander, I. M., von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T. M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8(5), 146–150. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01030-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01030-3)
- Henriques, M., Martins, M., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2007). Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* morphogenesis. *Letters in Applied Microbiology*, 44(2), 199–205. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2006.02044.X>
- Herald, P. J., & Zottola, E. A. (1988). Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel Surfaces at Various Temperatures and pH Values. *Journal of Food Science*, 53, 1549-1562.
- Hernandez, A., Tejerina, F., Arribas, J., Martínez, L., & Martínez, F. (1990). *Microfiltración, Ultrafiltración y Osmosis inversa*, 9. Editum. Ediciones de la Universidad de Murcia.
- Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B. K., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program

- COMSTAT. *Microbiology (Reading, England)*, 146(10), 2395–2407. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2009). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. In *Frontiers in Microbiology*, 9(9). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>
- Hogan, D. A. (2006). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic Cell*, 5(4), 613–619. <https://doi.org/10.1128/EC.5.4.613-619.2006>
- Hogan, D. A., Vik, Å., & Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular Microbiology*, 54(5), 1212–1223. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2004.04349.X>
- Hondrodimou, O., Kourkoutas, Y., & Panagou, E. Z. (2011). Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiology*, 28(3), 621–627. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.11.015>
- Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1997). Growth Media and Surface Conditioning Influence the Adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* Cells to Stainless Steel. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1034–1037. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.9.1034>
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisek, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., & Nickerson, K. W. (2001). Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2982–2992. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2982-2992.200>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(1), 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00012>
- Idigoras, G. (2014). Producción y procesamiento de productos frutihortícolas. *Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva*, 1–81.
- Iglesias, M. B., Viñas, I., Colás-Medà, P., Collazo, C., Serrano, J. C. E., & Abadias, M. (2017). Adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes* and interaction with *Lactobacillus rhamnosus* GG after habituation on fresh-cut pear. *Journal of Functional Foods*, 34, 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.011>

- Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H., & Shimada, J. (2004). The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 237(2), 325–331. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2004.06.049>
- Ivnitsky, H., Katz, I., Minz, D., Volvovic, G., Shimoni, E., Kesselman, E., Semiat, R., & Dosoretz, C. G. (2007). Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment. *Water Research*, 41(17), 3924–3935. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2007.05.021>
- Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. F., James, C. E., & Shirtliff, M. E. (2006). Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1463–1469. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1463-1469.2006>
- Jamshidi, A., & Zeinali, T. (2019). Significance and characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products. *International Journal of Food Science*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>
- Jarros, I. C., Veiga, F. F., Corrêa, J. L., Barros, I. L. E., Gadelha, M. C., Voidaleski, M. F., Perialisi, N., Pedroso, R. B., Vicente, V. A., Negri, M., & Svidzinski, T. I. E. (2019). Approaches by *Rhodotorula mucilaginosa* from a chronic kidney disease patient for elucidating the pathogenicity profile by this emergent species. *BioRxiv*, 701052. <https://doi.org/10.1101/701052>
- Jarros, I. C., Veiga, F. F., Corrêa, J. L., Barros, I. L. E., Pedroso, R. B., Negri, M., & Svidzinski, T. I. E. (2022). Farnesol modulation of *Rhodotorula mucilaginosa* in biofilm and planktonic forms. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 94(3). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220211127>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Modern Food Microbiology. *Modern Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/B100840>
- Jeleń, H. H. (2002). Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roqueforti* strains producing PR toxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6569–6574. <https://doi.org/10.1021/JF020311O>
- Jeong, D. K., & Frank, J. F. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *Journal of Food Protection*, 57(7), 576–586. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.7.576>

- Johansen, P., & Jespersen, L. (2017). Impact of quorum sensing on the quality of fermented foods. *Current Opinion in Food Science*, 13, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.001>
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The role and use of non-*saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27(1). <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>
- Jones-Lepp, T., Gerlach, C. L., & Cooter, E. J. (2000). The power of analytical methods for measuring suspected endocrine disrupting compounds: a pilot field study. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(5), 286–291. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00218-6)
- Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., & Settharaksa, S. (2013). In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, 22, 6–13. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2013.04.009>
- Kallinteri, L. D., Kostoula, O. K., & Savvaidis, I. N. (2013). Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese. *Food Microbiology*, 36(2), 176–181. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2013.05.006>
- Kamal, R. M., Alnakip, M. E., Abd El Aal, S. F., & Bayoumi, M. A. (2018). Bio-controlling capability of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* against some common foodborne pathogens in yoghurt. *International Dairy Journal*, 85, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.04.007>
- Karaman, K., Sagdic, O., & Yilmaz, M. T. (2016). Multiple response surface optimization for effects of processing parameters on physicochemical and bioactive properties of apple juice inoculated with *Zygosaccharomyces rouxii* and *Zygosaccharomyces bailii*. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 258–272. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.01.006>
- Karaman, K., Sagdic, O., & Yilmaz, M. T. (2020). Potential of natamycin to control growth of *Zygosaccharomyces* spp. in apple juice during storage. *International Journal of Food Microbiology*, 332, 108771. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108771>
- Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1–2), 35–62. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00309-5)
- Katragkou, A., Mccarthy, M., Alexander, E. L., Antachopoulos, C., Meletiadiis, J., Jabra-rizk, M. A., Petratis, V., Roilides, E., & Walsh, T. J. (2015). In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans*

- biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(2), 470–478. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKU374>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Khan, F., Bamunuarachchi, N. I., Pham, D. T. N., Tabassum, N., Khan, M. S. A., & Kim, Y. M. (2021). Mixed biofilms of pathogenic *Candida*-bacteria: regulation mechanisms and treatment strategies. In *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1921696>
- Khaneghah, A. M., & Fakhri, Y. (2018). Probiotics and Prebiotics as Functional Foods: State of the Art. *Current Nutrition & Food Science*, 15(1), 20–30. <https://doi.org/10.2174/1573401314666180416120241>
- Khelissa, S. O., Jama, C., Abdallah, M., Boukherroub, R., Faille, C., & Chihib, N. E. (2017). Effect of incubation duration, growth temperature, and abiotic surface type on cell surface properties, adhesion and pathogenicity of biofilm-detached *Staphylococcus aureus* cells. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S13568-017-0492-0>
- Kim, U., Kim, J.-H., & Oh, S.-W. (2021). Review of multi-species biofilm formation from foodborne pathogens: multi-species biofilms and removal methodology. 1–11. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1892585>
- Kim, Y. H., Lee, Y., Kim, S., Yeom, J., Yeom, S., Kim, B. S., Oh, S., Park, S., Jeon, C. O., & Park, W. (2006). The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the formation of biofilms. *Proteomics*, 6(23), 6181–6193. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200600320>
- Kim, Y., & Mylonakis, E. (2011). Killing of *Candida albicans* Filaments by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is Mediated by sopB Effectors, Parts of a Type III Secretion System. *Eukaryotic Cell*, 10(6), 782. <https://doi.org/10.1128/EC.00014-11>
- Kochkodan, V., & Hilal, N. (2015). A comprehensive review on surface modified polymer membranes for biofouling mitigation. *Desalination*, 356, 187–207. <https://doi.org/10.1016/J.DESAL.2014.09.015>
- Koo, H., Andes, D. R., & Krysan, D. J. (2018). *Candida*–streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathogens*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007342>
- Koo, Hyun., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Park, Y. K., & Bowen, W. H. (2002). Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase

- activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1302–1309. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1302-1309.2002>
- Koo, O. K., Ndahetuye, J. B., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C., & Crandall, P. G. (2014). Influence of *Listeria innocua* on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel and aluminum surfaces. *Food Control*, 39(1), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.008>
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2003). Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7514. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7514-7516.2003>
- Kovács, R., Bozó, A., Gesztelyi, R., Domán, M., Kardos, G., Nagy, F., Tóth, Z., & Majoros, L. (2016). Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(4), 304–310. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2016.01.007>
- Kovács, R., & Majoros, L. (2020). Fungal quorum-sensing molecules: a review of their antifungal effect against *Candida* biofilms. *Journal of Fungi*, 6(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/JOF6030099>
- Kragh, K. N., Hutchison, J. B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A. E. L., Irie, Y., Jensen, P., Diggle, S. P., Allen, R. J., Gordon, V., & Bjarnsholt, T. (2016). Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. *MBio*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00237-16>
- Krom, B. P., Levy, N., Meijler, M. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Farnesol and *Candida albicans*: Quorum Sensing or Not Quorum Sensing?. *Israel Journal of Chemistry*, 56(5), 295–301. <https://doi.org/10.1002/IJCH.201500025>
- Krug, M., Chapin, T., Danyluk, M., Goodrich-Schneider, R., Schneider, K., Harris, L., & Worobo, R. (2020). Outbreaks of foodborne disease associated with fruit and vegetable juices, 1922–2019. *EDIS*, 2020(5). <https://doi.org/10.32473/EDIS-FS188-2020>
- Kruppa, M. (2009). Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*, 52(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0507.2008.01626.X>
- Küçük, G. S., Çelik, Ö. F., Mazi, B. G., & Türe, H. (2020). Evaluation of alginate and zein films as a carrier of natamycin to increase the shelf life of kashar cheese. *Packaging Technology and Science*, 33(1), 39–48. <https://doi.org/10.1002/PTS.2483>
- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2), 9–27. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00060-9)

- Lalitha, P., Vijaykumar, R., Prajna, N. v., & Fothergill, A. W. (2008). In Vitro Natamycin Susceptibility of Ocular Isolates of *Fusarium* and *Aspergillus* Species: Comparison of Commercially Formulated Natamycin Eye Drops to Pharmaceutical-Grade Powder. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3477–3478. <https://doi.org/10.1128/JCM.00610-08>
- Lang, C., Böttner, M., Holz, C., Veen, M., Ryser, M., Reindl, A., Pompejus, M., & Tanzer, J. M. (2010). Specific *Lactobacillus/Mutans Streptococcus* co-aggregation. *Journal of Dental Research*, 89(2), 175–179. <https://doi.org/10.1177/0022034509356246>
- Laorko, A., Li, Z., Tongchitpakdee, S., & Youravong, W. (2011). Effect of gas sparging on flux enhancement and phytochemical properties of clarified pineapple juice by microfiltration. *Separation and Purification Technology*, 80(3), 445–451. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2011.05.024>
- Lappi, V. R., Thimothe, J., Walker, J., Bell, J., Gall, K., Moody, M. W., & Wiedmann, M. (2004). Impact of intervention strategies on *Listeria* contamination patterns in crawfish processing plants: a longitudinal study. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1163–1169. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.6.1163>
- Lazazzera, B. A. (2001). The intracellular function of extracellular signaling peptides. *Peptides*, 22(10), 1519–1527. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00488-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00488-0)
- Lee, A., Elam, J. W., & Darling, S. B. (2016). Membrane materials for water purification: design, development, and application. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2(1), 17–42. <https://doi.org/10.1039/C5EW00159E>
- Lee, C. Y., & Mattick, L. R. (1989). Composition and nutritive value of apple products. *Processed Apple Products*, 303–322. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8225-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8225-6_14)
- Lei, X., Deng, B., Ruan, C., Deng, L., & Zeng, K. (2022). Phenylethanol as a quorum sensing molecule to promote biofilm formation of the antagonistic yeast *Debaryomyces nepalensis* for the control of black spot rot on jujube. *Postharvest Biology and Technology*, 185, 111788. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2021.111788>
- Lelièvre, C., Legentilhomme, P., Gaucher, C., Legrand, J., Faille, C., & Bénézech, T. (2002). Cleaning in place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment. *Chemical Engineering Science*, 57(8), 1287–1297. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(02\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(02)00019-2)
- Lemon, K. P., Higgins, D. E., & Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4418–4424. <https://doi.org/10.1128/JB.01967-06>

- Leuschner, R. G. K., Robinson, T. P., Hugas, M., Cocconcelli, P. S., Richard-Forget, F., Klein, G., Licht, T. R., Nguyen-The, C., Querol, A., Richardson, M., Suarez, J. E., Thrane, U., Vlak, J. M., & von Wright, A. (2010). Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology*, 21(9), 425–435. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2010.07.003>
- Lewis, M., Yingling, G. L., Mattia, A., Beijing, A., Brussels, B., Dallas, C., Harrisburg, F., Irvine, H., Los, L., Miami, A., New, M., Palo, Y., Paris, A., Pittsburgh, P., San, P., Tokyo, F., & Wilmington, W. (2015). Gras notification for the use of natamycin in ready-to-drink tea beverages; fruit flavored energy, sport, and isotonic drinks; and fruit flavored drinks. In *GRAS notices No 578 Natamycin*. U.S. Food and Drug Administration. [https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=578&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=578](https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=578&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=578)
- Lewis, S. J., Gilmour, A., Fraser, T. W., & McCall, R. D. (1987). Scanning electron microscopy of soiled stainless steel inoculated with single bacterial cells. *International Journal of Food Microbiology*, 4(4), 279–284. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90002-X)
- Lilley, B. D., & Brewer, J. H. (1953). The selective antibacterial action of phenylethyl alcohol. *Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association*, 42(1), 6–8. <https://doi.org/10.1002/JPS.3030420103>
- Lindsay, D., & von Holy, A. (1997). Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*, 14(4), 383–390. <https://doi.org/10.1006/FMIC.1997.0102>
- Lingappa, B. T., Prasad, M., Lingappa, Y., Hunt, D. F., & Biemann, K. (1969). Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science (New York, N.Y.)*, 163(3863), 192–194. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.163.3863.192>
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 6), 645–659. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.46495-0>
- Liu, N. T., Nou, X., Lefcourt, A. M., Shelton, D. R., & Lo, Y. M. (2014). Dual-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 and environmental bacteria isolated from fresh-cut processing facilities. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 15–20. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.11.007>
- Lopes, A. P., de Oliveira Castelo Branco, R. R., de Alcântara Oliveira, F. A., Campos, M. A. S., de Carvalho Sousa, B., Agostinho, Í. R. C., Gonzalez, A. G. M., Rocha, J. A., Pinheiro,

- R. E. E., Araújo, A. R., & dos Santos Soares, M. J. (2021). Antimicrobial, modulatory, and antibiofilm activity of tt-farnesol on bacterial and fungal strains of importance to human health. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128192>
- Lorenz, M. C., Cutler, N. S., & Heitman, J. (2000). Characterization of Alcohol-induced Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(1), 183. <https://doi.org/10.1091/MBC.11.1.183>
- Löser, C., Urit, T., & Bley, T. (2014). Perspectives for the biotechnological production of ethyl acetate by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5397–5415. <https://doi.org/10.1007/S00253-014-5765-9>
- Lozano, J. E. (2006). *Fruit manufacturing: scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance: Vol. XI* (1st ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-30616-2>
- Lule, V. K., Garg, S., Gosewade, S. C., & Khedkar, C. D. (2015). Natamycin. In *Encyclopedia of Food and Health*, 56–62. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00482-7>
- Lunden, J. M., Miettinen, M. K., Autio, T. J., & Korkeala, H. J. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1204–1207. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.9.1204>
- Maciej Serda, Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqwu, W. K. H., Zklfk, E., Edvhg, L. v, ... ح, فاطمی (2000). Biofilms - Impact on Hygiene in the Food Industries. *Uniwersytet Śląski*, 7(1), 327–372. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., & Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel, Glass, Polypropylene, and Rubber Surfaces After Short Contact Times. *Journal of Food Protection*, 53(9). <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.9.742>
- Maillet, A., Denojean, P., Bouju-Albert, A., Scaon, E., Leuillet, S., Dousset, X., Jaffrès, E., Combrisson, J., & Prévost, H. (2021). Characterization of bacterial communities of cold-smoked salmon during storage. *Foods*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/FOODS10020362>
- Malik, A., Sakamoto, M., Ono, T., & Kakii, K. (2003). Coaggregation between *Acinetobacter johnsonii* S35 and *Microbacterium esteraromaticum* strains isolated from sewage

- activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(1), 10–15. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90090-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90090-9)
- Mariani, C., Oulahal, N., Chamba, J. F., Dubois-Brissonnet, Notz, E., & Briandet, R. (2011). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control*, 22(8), 1357–1362. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.02.012>
- Marques, S. C., Rezende, J. D. G. O. S., Alves, L. A. D. F., Silva, B. C., Alves, E., de Abreu, L. R., & Piccoli, R. H. (2007). Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 538–543. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300029>
- Martin, J. G. P., de Oliveira e Silva, G., da Fonseca, C. R., Morales, C. B., Souza Pamplona Silva, C., Miquelluti, D. L., & Porto, E. (2016). Efficiency of a cleaning protocol for the removal of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains in dairy plants. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 295–301. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.09.018>
- Martinez, R. C. R., Staliano, C. D., Vieira, A. D. S., Villarreal, M. L. M., Todorov, S. D., Saad, S. M. I., & Franco, B. D. G. de M. (2015). Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. *Food Microbiology*, 48, 143–152. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.12.010>
- Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S. M., Coimbra, M. A., & Oliveira, R. (2007). Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryotic Cell*, 6(12), 2429–2436. <https://doi.org/10.1128/EC.00252-07>
- Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S. M., Coimbra, M. A., & Oliveira, R. (2010). *Candida* species extracellular alcohols: Production and effect in sessile cells. *Journal of Basic Microbiology*, 50(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1002/jobm.200900442>
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, 56, 289–314. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.56.012302.160938>
- Mattos-Guaraldi, A. L., Formiga, L. C. D., & Andrade, A. F. B. (1999). Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Current Microbiology*, 38(1). <https://doi.org/10.1007/PL00006769>

- McAlester, G., O’Gara, F., & Morrissey, J. P. (2008). Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 57(5), 563–569. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.47705-0>
- McCollum, J. T., Cronquist, A. B., Silk, B. J., Jackson, K. A., O’Connor, K. A., Cosgrove, S., Gossack, J. P., Parachini, S. S., Jain, N. S., Ettestad, P., Ibraheem, M., Cantu, V., Joshi, M., DuVernoy, T., Fogg, N. W., Gorny, J. R., Mogen, K. M., Spires, C., Teitell, P., ... Mahon, B. E. (2013). Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Cantaloupe. *New England Journal of Medicine*, 369(10), 944–953. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1215837>
- McLeod, A., Nyquist, O. L., Snipen, L., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5), 393–403. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2008.06.002>
- Mehmood, A., Liu, G., Wang, X., Meng, G., Wang, C., & Liu, Y. (2019). Fungal quorum-sensing molecules and inhibitors with potential antifungal activity: A review. *Molecules*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/molecules24101950>
- Melián, C. V. (2021). *Interacción bacterias lácticas-Listeria monocytogenes en biofilms. Evaluación de metabolitos anti-quorum sensing*. Universidad Nacional de Tucumán.
- Meloni, D. (2014). Focusing on the main morphological and physiological characteristics of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Journal of Veterinary Science and Research*, 1(1).
- Merino, L. E. (2019). Empleo de bacterias lácticas y sus metabolitos como estrategia de biocontrol para disminuir la incidencia de cepas de *Salmonella* spp. formadoras de biopelículas en granjas avícolas [Doctorado, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/85495>
- Merkle, S., Kleeberg, K. K., & Fritsche, J. (2015). Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis—A Review. *Chromatography*, 2(3), 293–381. <https://doi.org/10.3390/CHROMATOGRAPHY2030293>
- Meylheuc, T., Giovannacci, I., Briandet, R., & Bellon-Fontaine, M. N. (2002). Comparison of the Cell Surface Properties and Growth Characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 65(5), 786–793. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.5.786>

- Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., O'Bryan, C., Crandall, P. G., Johnson, M. G., & Ricke, S. C. (2012). A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), 712–725. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.507909>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165–199. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.55.1.165>
- Ministerio de Salud. (2007). Manual de normas y procedimientos de Vigilancia y Control de Enfermedades de Notificación Obligatoria. In *Revisión Nacional*. Presidencia de la Nación.
- Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.10.047>
- Mohamed, M. A. N., Ranjard, L., Catroux, C., Catroux, G., & Hartmann, A. (2005). Effect of natamycin on the enumeration, genetic structure and composition of bacterial community isolated from soils and soybean rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, 60(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.08.008>
- Mohammad, A. W., Ng, C. Y., Lim, Y. P., & Ng, G. H. (2012). Ultrafiltration in food processing industry: Review on application, membrane fouling, and fouling control. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1143–1156. <https://doi.org/10.1007/S11947-012-0806-9>
- Moltz, A. G., & Martin, S. E. (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*, 68(1), 92–97. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.1.92>
- Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2), 73–87. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2008.11.001>
- Montañez-Izquierdo, V. Y., Salas-Vázquez, D. I., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2012). Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control*, 23(2), 470–477. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.08.016>
- Monteiro, D. R., Arias, L. S., Fernandes, R. A., Deszo da Silva, L. F., de Castilho, M. O. V. F., da Rosa, T. O., Vieira, A. P. M., Straioto, F. G., Barbosa, D. B., & Delbem, A. C. B. (2017). Antifungal activity of tyrosol and farnesol used in combination against *Candida*

- species in the planktonic state or forming biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 392–400. <https://doi.org/10.1111/jam.13513>
- Montville, T. J., & Chen, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(5), 511–519. <https://doi.org/10.1007/S002530051328>
- Moons, P., Michiels, C. W., & Aertsen, A. (2009). Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(3), 157–168. <https://doi.org/10.1080/10408410902809431>
- Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2–3), 73–83. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2012.07.001>
- Mørretrø, T., Heir, E., Nesse, L. L., Vestby, L. K., & Langsrud, S. (2012). Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International*, 45(2), 532–544. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.02.002>
- Mørretrø, T., & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1(2), 107–121. <https://doi.org/10.1017/s1479050504001322>
- Mosquera-Fernández, M., Rodríguez-López, P., Cabo, M. L., & Balsa-Canto, E. (2014). Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 182–183, 26–36. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2014.05.005>
- Muñoz, A. I., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., & Guzmán, V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C., 2002-2008. *Biomédica*, 31(3), 428–467.
- Nagpal, R., Kumar, A., & Kumar, M. (2012). Fortification and fermentation of fruit juices with probiotic lactobacilli. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1573–1578. <https://doi.org/10.1007/S13213-011-0412-5>
- Navarathna, D. H. M. L. P., Nickerson, K. W., Duhamel, G. E., Jerrels, T. R., & Petro, T. M. (2007). Exogenous Farnesol Interferes with the Normal Progression of Cytokine Expression during Candidiasis in a Mouse Model. *Infection and Immunity*, 75(8), 4006. <https://doi.org/10.1128/IAI.00397-07>
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>

- Norwood, D. E., Gilmour, A., Oo, R. W., An, D., & Gi, D. A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 512–520. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2000.00990.X>
- Nunes, S. P., & Peinemann, K.-V. (2001). Membrane Materials and Membrane Preparation. In *Membrane Technology in the Chemical Industry* (2nd ed., Vol. 2). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Nyenje, M. E., Green, E., & Ndip, R. N. (2012). Biofilm formation and adherence characteristics of *Listeria ivanovii* strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. *The Scientific World Journal*, vol 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/873909>
- Oh, K. B., Miyazawa, H., Naito, T., & Matsuoka, H. (2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4664–4668. <https://doi.org/10.1073/PNAS.071404698>
- Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., & Igimi, S. (2004). Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiology and Infection*, 132(4), 769–772. <https://doi.org/10.1017/S0950268804001967>
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Ollé Resa, C. P., Jagus, R. J., & Gerschenson, L. N. (2014). Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. *Food Control*, 35(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.06.049>
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 34(5), 877–886. <https://doi.org/10.1007/S10096-015-2323-Z>
- Olsen, S. J., Patrick, M., Hunter, S. B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W. R., Lane, K., Bidol, S., Stoltman, G. A., Frye, D. M., Lee, I., Hurd, S., Jones, T. F., LaPorte, T. N., Dewitt, W., Graves, L., Wiedmann, M., Schoonmaker-Bopp, D. J., Huang, A. J., ... Mead, P. (2005). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *Clinical Infectious Diseases*, 40(7), 962–967. <https://doi.org/10.1086/428575/2/40-7-962>

- OMS. (2020, April 30). *Inocuidad de los alimentos*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998a). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, *30*(2), 295–304. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1998.01062.X>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, *28*(3), 449–461. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1998.00797.X>
- Padder, S. A., Prasad, R., & Shah, A. H. (2018). Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiological Research*, *210*, 51–58. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.03.007>
- Padola, N. L., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Etcheverria, A. I., Arroyo, G. H., Usera, M. A., & Parma, A. E. (2004). Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Veterinary Microbiology*, *100*(1–2), 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00127-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00127-5)
- Pakbin, B., Razavi, S. H., Mahmoudi, R., & Gajarbeygi, P. (2014). Producing Probiotic Peach Juice. *Biotechnology and Health Sciences*, *1*(3). <https://doi.org/10.17795/BHS-24683>
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology*, *63*, 191–198. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2016.11.021>
- Paramonova, E., Krom, B. P., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., & Sharma, P. K. (2009). Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms. *Microbiology (Reading, England)*, *155*(Pt 6), 1997–2003. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.021568-0>
- Park, N., Kwon, B., Kim, I. S., & Cho, J. (2005). Biofouling potential of various NF membranes with respect to bacteria and their soluble microbial products (SMP): Characterizations, flux decline, and transport parameters. *Journal of Membrane Science*, *258*(1–2), 43–54. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2005.02.025>
- Patel, A. R. (2017). Probiotic fruit and vegetable juices-recent advances and future perspective. *International Food Research Journal* (Vol. 24, Issue 5).
- Pawliszyn, J. (1999). *Applications of Solid Phase Microextraction* (J. Pawliszyn, Ed.; Vol. 5, Issue 1). Royal Society of Chemistry.

[https://books.google.com/books/about/Applications\\_of\\_Solid\\_Phase\\_Microextract.html?hl=es&id=M5TTT\\_8WfW0C](https://books.google.com/books/about/Applications_of_Solid_Phase_Microextract.html?hl=es&id=M5TTT_8WfW0C)

- Peleg, A. Y., Tampakakis, E., Fuchs, B. B., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., & Mylonakis, E. (2008). Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14585–14590. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0805048105>
- Pellicer, K. E., Copes, J. A., Malvestiti, L., Lanfranchini, M. E., Stanchi, N. O., Echeverría, M. G., & Nosetto, E. O. (2002). Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* en embutidos secos obtenidos en mercados de la ciudad de La Plata, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 34, no. 4. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/102784>
- Pendergast, M. M., & Hoek, E. M. V. (2011). A review of water treatment membrane nanotechnologies. *Energy & Environmental Science*, 4(6), 1946–1971. <https://doi.org/10.1039/C0EE00541J>
- Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., & Malcata, F. X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria – With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology*, 26(1), 31–42. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2012.01.006>
- Pérez-Ibarreche, M., Castellano, P., Leclercq, A., & Vignolo, G. (2016). Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. *FEMS Microbiology Letters*, 363(12), 1–6. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw118>
- Perricone, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Speranza, B., & Bevilacqua, A. (2014). Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. *Journal of Functional Foods*, 10, 421–426. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.07.020>
- Pietrysiak, E., Smith, S., & Ganjyal, G. M. (2019). Food Safety Interventions to Control *Listeria monocytogenes* in the Fresh Apple Packing Industry: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 1705–1726. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12496>
- Plutowska, B., & Wardencki, W. (2007). Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, 101(2), 845–872. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.12.028>
- Poimenidou, S., Belessi, C. A., Giaouris, E. D., Gounadaki, A. S., Nychas, G. J. E., & Skandamis, P. N. (2009). *Listeria monocytogenes* Attachment to and Detachment from

- Stainless Steel Surfaces in a Simulated Dairy Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7182. <https://doi.org/10.1128/AEM.01359-09>
- Poimenidou, S. v., Chrysadaku, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V. C., Nychas, G. J., & Skandamis, P. N. (2016). Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.029>
- Pottathil, M., Jung, A., & Lazazzera, B. A. (2008). CSF, a Species-Specific Extracellular Signaling Peptide for Communication among Strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 4095. <https://doi.org/10.1128/JB.00187-08>
- Pousti, M., Lefèvre, T., Amirdehi, M. A., & Greener, J. (2019). A surface spectroscopy study of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm in the presence of an immobilized air bubble. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 222, 117163. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2019.117163>
- Querol, A., & Fleet, G. (2006). Yeasts in Food and Beverages. *Yeasts in Food and Beverages*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0>
- Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & López-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5459–5463. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5459-5463.2002>
- Ramos, B., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2013). Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2013.07.002>
- Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4885-90 <https://doi:10.1073/pnas.060030097>
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 157-180. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00076.x>
- Renier, S., Hébraud, M., & Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne

- pathogen. *Environmental Microbiology*, 13(4), 835–850. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2010.02378.X>
- Richardson, S. D. (2002). Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 74(12), 2719–2741. <https://doi.org/10.1021/AC020211H>
- Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., & Handley, P. S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 11(2), 94–100. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00034-3)
- Ringø, E., & Gatesoupe, F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160(3–4), 177–203. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00299-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00299-8)
- Ripolles-Avila, C., Hascoët, A. S., Guerrero-Navarro, A. E., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2018). Establishment of incubation conditions to optimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food Control*, 92, 240–248. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.04.054>
- Rivas, M., Chinen, I., Miliwebsky, E., & Masana, M. (2014). Risk Factors for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*-Associated Human Diseases. *Microbiology Spectrum*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.EHEC-0002-2013>
- Rivero, M. A., Padola, N. L., Etcheverria, A. I., & Parma, A. E. (2004). *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 64(4), 352–356. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0025-76802004000400014](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0025-76802004000400014)
- Rocourt, J., Jacquet, C., & Reilly, A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62(3), 197–209. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00336-6)
- Rodes, L., Khan, A., Paul, A., Coussa-Charley, M., Marinescu, D., Tomaro-Duchesneau, C., Shao, W., Kahouli, I., & Prakash, S. (2013). Effect of probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: an in vitro study using a human colonic microbiota model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 518–526. <https://doi.org/10.4014/JMB.1205.05018>
- Rodrigues, C. F., & Černáková, L. (2020). Farnesol and tyrosol: Secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. *Genes*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/genes11040444>

- Rodrigues, M. E., Gomes, F., & Rodrigues, C. F. (2020). *Candida* spp./Bacteria Mixed Biofilms. *Journal of Fungi*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/JOF6010005>
- Roldán, M. L., Otero, J. L., Villarreal, F., Baroni, M. R., Carrasco, M. S., Álvarez, C., Russell-White, K., Méndez, E. de los Á., & Simonetta, A. C. (2005). Efecto inhibitor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(1), 37–41. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-631673>
- Römling, U., & Rohde, M. (1999). Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiology Letters*, 180(1), 91–102. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1999.TB08782.X>
- Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S., & Reinköster, J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, 36(1), 10–23. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2000.01822.X>
- Rosenberg, M., & Kjelleberg, S. (1986). Hydrophobic Interactions: Role in Bacterial Adhesion. In K. C. Marshall (Ed.), *Advances in Microbial Ecology* (Vol. 9, pp. 353–393). Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_8)
- Rossi, M. L., Paiva, A., Tornese, M., Chianelli, S., & Troncoso, A. R. (2008). Brotes de infección por histeria monocytogenes: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Revista Chilena de Infectología*, 25(5), 328–335. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182008000500002>
- Rotowa, N. A., Shadomy, H. J., & Shadomy, S. (1990). In vitro activities of polyene and imidazole antifungal agents against unusual opportunistic fungal pathogens. *Mycoses*, 33(4), 203–211. <https://doi.org/10.1111/MYC.1990.33.4.203>
- Sado, P. N., Jinneman, K. C., Husby, G. J., Sorg, S. M., & Omiecinski, C. J. (1998). Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurized apple juice using rapid test kits. *Journal of Food Protection*, 61(9), 1199–1202. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.9.1199>
- Sagong, H. G., Lee, S. Y., Chang, P. S., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y. J., & Kang, D. H. (2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 287–292. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.01.010>

- Sanchez, E. E. (2020). Programa Nacional Frutales. Superficie ocupada por plantaciones frutales en el país y cambios en su estructura productiva. INTA. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/7906>
- Sanchez, E., & Villareal, P. (2012). Cadena frutales de pepita. In *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)*.
- Sangermani, M., Hug, I., Sauter, N., Pfohl, T., & Jenal, U. (2019). Tad pili play a dynamic role in *caulobacter crescentus* surface colonization. *MBio*, *10*(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01237-19>
- Santos, J. C. P., Sousa, R. C. S., Otoni, C. G., Moraes, A. R. F., Souza, V. G. L., Medeiros, E. A. A., Espitia, P. J. P., Pires, A. C. S., Coimbra, J. S. R., & Soares, N. F. F. (2018). Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *48*, 179–194. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.008>
- Sarno, E., Pezzutto, D., Rossi, M., Liebana, E., & Rizzi, V. (2021). A review of significant european foodborne outbreaks in the last decade. *Journal of Food Protection*, *84*(12), 2059–2070. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-096>
- Sasahara, K. C., & Zottola, E. A. (1993). Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Utilizes a Primary Colonizing Microorganism in Flowing Systems. *Journal of Food Protection*, *56*(12), 1022–1028. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.12.1022>
- Savard, P., Lamarche, B., Paradis, M. E., Thiboutot, H., Laurin, É., & Roy, D. (2011). Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*, *149*(1), 50–57. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.12.026>
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Mahon, B. E., Jones, T. F., & Griffin, P. M. (2015). An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiology and Infection*, *143*(13), 2795–2804. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003185>
- Schachter, B. (2003). Slimy business—the biotechnology of biofilms. *Nature Biotechnology*, *21*(4), 361–365. <https://doi.org/10.1038/nbt0403-361>
- Schirm, M., Kalmokoff, M., Aubry, A., Thibault, P., Sandoz, M., & Logan, S. M. (2004). Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with  $\beta$ -O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Bacteriology*, *186*(20), 6721–6727. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6721-6727.2004>

- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., & Broome, C. v. (1983). Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *The New England Journal of Medicine*, 308(4), 203–206. <https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407>
- Schulz, S., & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: The smell of small organisms. In *Natural Product Reports* (Vol. 24, Issue 4, pp. 814–842). <https://doi.org/10.1039/b507392h>
- Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., & Garbeva, P. (2017). Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 2484. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02484/BIBTEX>
- Scott, K. (1998). Handbook of Industrial Membranes - Absorption, desorption and extraction with membranes. In *Handbook of Industrial Membranes*. Elsevier. <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9781856172332/handbook-of-industrial-membranes>
- Seal, B. S., Drider, D., Oakley, B. B., Brüssow, H., Bikard, D., Rich, J. O., Miller, S., Devillard, E., Kwan, J., Bertin, G., Reeves, S., Swift, S. M., Raicek, M., & Gay, C. G. (2018). Microbial-derived products as potential new antimicrobials. *Veterinary Research*, 49(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13567-018-0563-5>
- Shah, A. A., Qian, C., Wu, J., Liu, Z., Khan, S., Tao, Z., Zhang, X., Khan, I. U., & Zhong, X. (2020). Effects of natamycin and *Lactobacillus plantarum* on the chemical composition, microbial community, and aerobic stability of *Hybrid pennisetum* at different temperatures. *RSC Advances*, 10(15), 8692–8702. <https://doi.org/10.1039/D0RA00028K>
- Shanmughapriya, S., Sornakumari, H., Lency, A., Kavitha, S., & Natarajaseenivasan, K. (2014). Synergistic effect of amphotericin B and tyrosol on biofilm formed by *Candida krusei* and *Candida tropicalis* from intrauterine device users. *Medical Mycology*, 52(8), 853–861. <https://doi.org/10.1093/MMY/MYU046>
- Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - A case. *Food Control*, 13(6–7), 469–477. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00068-8)
- Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(2), 279–284. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2007.01.007>

- Shikongo-Nambabi, M. N. N. N., Shoolongela, A., & Schneider, M. (2012). Control of bacterial contamination during marine fish processing. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1). <https://doi.org/10.5296/JBLS.V3I1.1033>
- Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2015.11.001>
- Silveira, M., Fernandes, M., Leilah, M., Lourenço, M. C., Vasconcelos, B. M., & Carneiro, V. A. (2019). Probiotics *Lactobacillus* strains: A promising alternative therapy against biofilm-forming enteropathogenic bacteria?. *African Journal of Microbiology Research*, 13(28), 544–551. <https://doi.org/10.5897/AJMR2019.9155>
- Simões, L. C., Simões, M., & Vieira, M. J. (2010). Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6673. <https://doi.org/10.1128/AEM.00872-10>
- Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17(4), 439–447. <https://doi.org/10.1006/FMIC.2000.0339>
- Sofos, J. N., & Geornaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86(1), 2–14. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2010.04.015>
- Speranza, B., Liso, A., Russo, V., & Corbo, M. R. (2020). Evaluation of the potential of biofilm formation of *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* and *Lactobacillus reuteri* as competitive biocontrol agents against pathogenic and food spoilage bacteria. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020177>
- Speranza, B., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2009). Non starter lactic acid bacteria biofilms: A means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Food Control*, 20(11), 1063–1067. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2009.01.006>
- Sprague, G. F., & Winans, S. C. (2006). Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes & Development*, 20(9), 1045–1049. <https://doi.org/10.1101/GAD.1432906>
- Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., & Švabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428–432. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>

- Stern, G. A. (1978). In vitro antibiotic synergism against ocular fungal isolates. *American Journal of Ophthalmology*, 86(3), 359–367. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(78\)90240-4](https://doi.org/10.1016/0002-9394(78)90240-4)
- Stewart, P. S. (2003). Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1485–1491. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276), 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187–209. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.56.012302.160705>
- Streekstra, H., Verkennis, A. E. E., Jacobs, R., Dekker, A., Stark, J., & Dijksterhuis, J. (2016). Fungal strains and the development of tolerance against natamycin. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.08.006>
- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222–227. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1)
- Tahmourespour, A., & Kermanshahi, R. K. (2011). The effect of a probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral *Streptococci*. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 11(1), 37–40. <https://doi.org/10.17305/BJBMS.2011.2621>
- Tait, E., Perry, J. D., Stanforth, S. P., & Dean, J. R. (2014). Bacteria detection based on the evolution of enzyme-generated volatile organic compounds: determination of *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Analytica Chimica Acta*, 848, 80–87. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2014.07.029>
- Takahashi, H., Suda, T., Tanaka, Y., & Kimura, B. (2010). Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), 618–625. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2010.02842.X>
- Tang, X., Flint, S. H., Bennett, R. J., Brooks, J. D., & Morton, R. H. (2009). Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy industry on ultrafiltration membranes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(12), 1491–1497. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0637-5>

- Tarifa, M. C. (2017). *Formación de biofilms en sistemas de filtración por membranas* [Doctorado, Universidad Nacional del Sur]. <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/3658>
- Tarifa, M. C., Brugnoli, L. I., & Lozano, J. E. (2013). Role of hydrophobicity in adhesion of wild yeast isolated from the ultrafiltration membranes of an apple juice processing plant. *Biofouling*, 29(7), 841–853. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.808628>
- Tarifa, M. C., Lozano, J. E., & Brugnoli, L. I. (2015). Dual-species relations between *Candida tropicalis* isolated from apple juice ultrafiltration membranes, with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2), 431–442. <https://doi.org/10.1111/jam.12710>
- Tarifa, M. C., Lozano, J. E., & Brugnoli, L. I. (2017). *Candida krusei* isolated from fruit juices ultrafiltration membranes promotes colonization of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on stainless steel surfaces. *Journal of Microbiology*, 55(2), 96–103. <https://doi.org/10.1007/S12275-017-6300-3>
- Tarifa, M. C., Lozano, J. E., & Brugnoli, L. I. (2018). Disinfection efficacy over yeast biofilms of juice processing industries. *Food Research International*, 105, 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.018>
- Tchoufag, J., Ghosh, P., Pogue, C. B., Nan, B., & Mandadapu, K. K. (2019). Mechanisms for bacterial gliding motility on soft substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(50), 25087–25096. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1914678116>
- te Welscher, Y. M., ten Napel, H. H., Balagué, M. M., Souza, C. M., Riezman, H., de Kruijff, B., & Breukink, E. (2008). Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6393–6401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707821200>
- Telgmann, U., Horn, H., & Morgenroth, E. (2004). Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Research*, 38(17), 3671–3684. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2004.05.020>
- Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H., & Samaranayake, L. P. (2006). Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 51(8), 672–680. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2006.02.005>
- Thimothe, J., & Nightingale, K. K. (2004). Tracking of *Listeria monocytogenes* in Smoked Fish Processing Plants. *Journal of Food Protection*, 67(2), 328–341. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.2.328>

- Thuptimdang, P., Limpiyakorn, T., McEvoy, J., Prüß, B. M., & Khan, E. (2015). Effect of silver nanoparticles on *Pseudomonas putida* biofilms at different stages of maturity. *Journal of Hazardous Materials*, 290, 127–133. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2015.02.073>
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., & Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *Journal of Bacteriology*, 182(22), 6482–6489. <https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6482-6489.2000>
- Tomás, M. S. J., Claudia Otero, M., Ocaña, V., & Elena Nader-Macías, M. (2004). Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 268, 337–346. <https://doi.org/10.1385/1-59259-766-1:337>
- Tomás, M. S. J., Ocaña, V. S., Wiese, B., & Nader-Macías, M. E. (2003). Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 52(12), 1117–1124. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.05155-0>
- Tornai-Lehoczki, J., Péter, G., & Dlačny, D. (2003). CHROMagar *Candida* medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00256-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00256-3)
- Tortorello, M. lou, & Gendel, S. M. (1997). Special techniques for studying microbial biofilms in food systems: Edmund A. Zottola University of Minnesota St. Paul, Minnesota. *Food Microbiology and Analytical Methods*, 331–362. <https://doi.org/10.1201/9781482269833-19>
- Tournas, V. H., Heeres, J., & Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23(7), 684–688. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2006.01.003>
- Toushik, S. H., Kim, K., Ashrafudoulla, M., Mizan, M. F. R., Roy, P. K., Nahar, S., Kim, Y., & Ha, S. do. (2021). Korean kimchi-derived lactic acid bacteria inhibit foodborne pathogenic biofilm growth on seafood and food processing surface materials. *Food Control*, 129, 108-276. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108276>
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225–241. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.04.030>

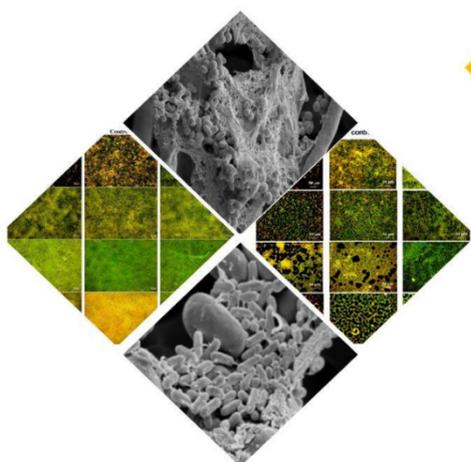
- Tsiraki, M. I., & Savvaidis, I. N. (2014). Citrus extract or natamycin treatments on “Tzatziki” – A traditional Greek salad. *Food Chemistry*, 142, 416–422. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.07.087>
- Twetman, L., Larsen, U., Fiehn, N. E., Steckésn-Blicks, C., & Twetman, S. (2009). Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: An in vitro study. *Acta Odontol Scand*, 67(5), 284–288. <https://doi.org/10.1080/00016350902984237>
- Ukuku, D. O., & Fett, W. F. (2002). Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind. *Journal of Food Protection*, 65(7), 1093–1099. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.7.1093>
- Ukuku, D. O., Geveke, D. J., Chau, L., & Niemira, B. A. (2016). Microbial safety and overall quality of cantaloupe fresh-cut pieces prepared from whole fruit after wet steam treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 231, 86–92. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.05.019>
- Ulbricht, M. (2006). Advanced functional polymer membranes. *Polymer*, 47(7), 2217–2262. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2006.01.084>
- Uppuluri, P., Mekala, S., & Chaffin, W. L. J. (2007). Farnesol-mediated inhibition of *Candida albicans* yeast growth and rescue by a diacylglycerol analogue. *Yeast (Chichester, England)*, 24(8), 681–693. <https://doi.org/10.1002/YEA.1501>
- Urošević, T., Povrenović, D., Vukosavljević, P., Urošević, I., & Stevanović, S. (2017). Recent developments in microfiltration and ultrafiltration of fruit juices. *Food and Bioprocess Processing*, 106, 147–161. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.09.009>
- van Haute, S., Sampers, I., Holvoet, K., & Uyttendaele, M. (2013). Physicochemical quality and chemical safety of chlorine as a reconditioning agent and wash water disinfectant for fresh-cut lettuce washing. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2850–2861. <https://doi.org/10.1128/AEM.03283-12>
- van Leeuwen, M. R., Smant, W., de Boer, W., & Dijksterhuis, J. (2008). Filipin is a reliable in situ marker of ergosterol in the plasma membrane of germinating conidia (spores) of *Penicillium discolor* and stains intensively at the site of germ tube formation. *Journal of Microbiological Methods*, 74(2–3), 64–73. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2008.04.001>
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D., & Waites, W. M. (2000). Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 860–863. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.860-863.2000>

- Visick, K. L., & Fuqua, C. (2005). Decoding microbial chatter: cell-cell communication in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5507–5519. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5507-5519.2005>
- Vlková, E., Rada, V., Šmehilová, M., & Killer, J. (2008). Auto-aggregation and co-aggregation ability in *Bifidobacteria* and *Clostridia*. *Folia Microbiologica*, 53(3), 263–269. <https://doi.org/10.1007/S12223-008-0040-Z>
- Vorst, K. L., Todd, E. C. D., & Ryser, E. T. (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *Journal of Food Protection*, 69(3), 619–626. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.3.619>
- Walker, M., & Phillips, C. A. (2008). The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. *Food Control*, 19(10), 974–981. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2007.10.003>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319–346. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.21.012704.131001>
- Weber, K., Sohr, R., Schulz, B., Fleischhacker, M., & Ruhnke, M. (2008). Secretion of E,E-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(5), 1859. <https://doi.org/10.1128/AAC.01646-07>
- Wen, Y., Yuan, J., Ma, X., Wang, S., & Liu, Y. (2019). Polymeric nanocomposite membranes for water treatment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1539–1551. <https://doi.org/10.1007/S10311-019-00895-9>
- Westall, S. (1998). Characterisation of yeast species by their production of volatile metabolites. *Journal of Food Mycology*, 187–202.
- Whitehead, K. A., & Verran, J. (2015). Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 2, 84–91. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2015.02.003>
- Willaert, R., & Nedovic, V. (2006). Primary beer fermentation by immobilised yeast—a review on flavour formation and control strategies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(8), 1353–1367. <https://doi.org/10.1002/JCTB.1582>
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., & Cámara, M. (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1119. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2007.2039>

- Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, C., Brooks, T. D., Wilson, E., Clement, B., Wentworth, C. D., & Holmes, A. E. (2017). Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Research & Reviews. Journal of Engineering and Technology*, 6(4). <http://www.royj.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-minireview-.pdf>.
- Wong, P. C. Y., Kwon, Y. N., & Criddle, C. S. (2009). Use of atomic force microscopy and fractal geometry to characterize the roughness of nano-, micro-, and ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 1–2(340), 117–132. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2009.05.018>
- Wongsuk, T., Pumeesat, P., & Luplertlop, N. (2016). Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*, 56(5), 440–447. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201500759>
- Woo, J., & Ahn, J. (2013). Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 56(4), 307–313. <https://doi.org/10.1111/LAM.12051>
- Wu, M., Dong, Q., Ma, Y., Yang, S., Zohaib Aslam, M., Liu, Y., & Li, Z. (2022). Potential antimicrobial activities of probiotics and their derivatives against *Listeria monocytogenes* in food field: A review. *Food Research International*, 160, 111733. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111733>
- Xia, J., Qian, F., Xu, W., Zhang, Z., & Wei, X. (2017). In vitro inhibitory effects of farnesol and interactions between farnesol and antifungals against biofilms of *Candida albicans* resistant strains. *Biofouling*, 33(4), 283–293. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1295304>
- Xu, D., Jia, R., Li, Y., & Gu, T. (2017). Advances in the treatment of problematic industrial biofilms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33(5). <https://doi.org/10.1007/S11274-016-2203-4>
- Xu, Y., Pang, G., Gao, C., Zhao, D., Zhou, L., Sun, S., & Wang, B. (2009). In vitro comparison of the efficacies of natamycin and silver nitrate against ocular fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1636–1638. <https://doi.org/10.1128/AAC.00697-08>
- Yapıcı, M., Bükay, & Gürsu, Y., & Dağ, İ. (2021). In vitro antibiofilm efficacy of farnesol against *Candida* species. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 24(2), 251–262. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00162-4>

- Yousefi, M., Khorshidian, N., & Hosseini, H. (2020). Potential application of essential oils for mitigation of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry products. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2020.577287>
- Yuan, L., Hansen, M. F., Røder, H. L., Wang, N., Burmølle, M., & He, G. (2020). Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 60, Issue 13). <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1632790>
- Zago, C. E., Silva, S., Sanitá, P. V., Barbugli, P. A., Dias, C. M. I., Lordello, V. B., & Vergani, C. E. (2015). Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between *Candida albicans* and Methicillin-Susceptible (MSSA) and -Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLOS ONE*, 10(4), e0123206. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123206>
- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, S. (2020). Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(9). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>
- Zhang, Q., Xiang, J., Lv, W., Liu, Y., Sun, J., Wan, P., & Jiang, L. (2022). Quorum sensing molecules in yeast wastewater treatment and their regulation of yeast cell morphology. *Journal of Water Process Engineering*, 49, 103191. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103191>
- Zhang, Z., Yang, M. J., & Pawliszyn, J. (1994). Solid-Phase Microextraction: A solvent-free alternative for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 66(17), 844A-853A. <https://doi.org/10.1021/AC00089A001>
- Zhao, T., Podtburg, T. C., Zhao, P., Schmidt, B. E., Baker, D. A., Cords, B., & Doyle, M. P. (2006). Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3314–3320. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3314-3320.2006>
- Zhao, T., Teresa, C. P., Zhao, P., Chen, D., Baker, D. A., Cords, B., & Doyle, M. P. (2013). Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. *Journal of Food Protection*, 76(4), 601–607. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-323>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and

- union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004107>
- Zhou, Q., Feng, F., Wang, L., Feng, X., Yin, X., & Luo, Q. (2011). Virulence regulator PrfA is essential for biofilm formation in *Listeria monocytogenes* but not in *Listeria innocua*. *Current Microbiology*, 63(2), 186–192. <https://doi.org/10.1007/S00284-011-9964-7>
- Zips, A., Schaule, G., & Flemming, H. C. (1990). Ultrasound as a means of detaching biofilms. *Biofouling*, 2(4), 323–333. <https://doi.org/10.1080/08927019009378154>
- Zobell, C. E. (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1), 39. <https://doi.org/10.1128/JB.46.1.39-56.1943>
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1452–1463. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2001.02337.X>
- Zubeldia, H. (2007). *Breve comentario sobre el sector frutícola regional*. Secretaría de Fruticultura.



# ANEXO

## ANEXO

### Trabajos publicados y presentaciones a congresos

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados en la presente tesis sirvieron para su publicación en congresos de la especialidad de alcance nacional e internacional además de artículos científicos en revistas de reconocimiento internacional y de relevancia en el tema. Los mismos se detallan a continuación.

#### Publicaciones en revistas internacionales

- Tarifa M.C., **Agustín, M.R.**, Brugnoli, L.I. (2023). Biological control of foodborne pathogens by lactic acid bacteria: a focus on juice processing industries. *Revista Argentina de Microbiología*. Aceptado para su publicación. (Ref. RAM-D-22-00077).
- Agustín, M. D. R.**, & Brugnoli, L. (2018). Multispecies biofilms between *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* with resident microbiota isolated from apple juice processing equipment. *Journal of Food Safety*, 38(5). <https://doi.org/10.1111/jfs.12499>
- Agustín, M. del R.**, Tarifa, M. C., Vela-Gurovic, M. S., & Brugnoli, L. I. (2022). Application of natamycin and farnesol as bioprotection agents to inhibit biofilm formation of yeasts and foodborne bacterial pathogens in apple juice processing lines. *Food Microbiology*, 104123. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2022.104123>
- Agustín, M.**, Viceconte, F. R., Vela Gurovic, M. S., Costantino, A., & Brugnoli, L. I. (2019). Effect of quorum sensing molecules and natamycin on biofilms of *Candida tropicalis* and other yeasts isolated from industrial juice filtration membranes. *Journal of Applied Microbiology*, 126(6). <https://doi.org/10.1111/jam.14248>

#### Resúmenes presentados en congresos

##### Nacionales

- ✓“Interacción entre microbiota residente de membranas de ultrafiltración y bacterias patógenas en biofilms multiespecie”. **Agustín M.R.**, Tarifa M.C., Vela-Gurovic M.S, Brugnoli L.I. (2021) XIX Jornadas Argentinas de Microbiología. Argentina. 6 y 7 de octubre. Presentación oral. Publicado. 978-987-48142-5-8.

✓“Cuantificación de 2-feniletanol en biofilms de *Candida tropicalis* mediante HS/SPME”. **Agustín, M.R.**, Vela-Gurovic M.S, Brugnoni L.I. (2019) SINAQO XXII, Simposio Nacional de Química Orgánica. Argentina. Presentación formato poster.

✓“*Lactobacillus casei* ATCC 393 como agente de biocontrol de bacterias patógenas en jugos de frutas”. Tarifa M.C., **Agustín, M.R.**, Brugnoni L.I. (2019) XV Congreso Argentino de Microbiología. V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. V Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos. XIV Congreso Argentino de Microbiología General (XIV SAMI). Argentina. Publicado. Presentado formato poster. ISBN 9789874670151. 25 al 27 de septiembre. Presentación formato poster.

✓“Caracterización fenotípica de *Listeria monocytogenes* a diferentes temperaturas: movilidad, producción de EPS, supervivencia en jugo de manzana e interacciones con levaduras residentes de la industria” **Agustín, M.R.**, Brugnoni L.I. (2018) IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental y I Jornada de Microbiología General. Mar del Plata, Argentina, 11, 12 y 13 de abril. Presentación oral.

✓ “Biofilms multiespecie formado por *Listeria* y levaduras aisladas de membranas de ultrafiltración de jugo de manzana”. **Agustín, M.R.**, Brugnoni L.I. (2018) IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental y I Jornada de Microbiología General. Mar del Plata, Argentina, 11, 12 y 13 de abril. Presentación formato poster.

### Internacionales

✓“Eficiencia del hipoclorito de sodio como agente desinfectante sobre levaduras de interés industrial”. Marucci P.L., Tarifa M.C., **Agustín M.R.**, Brugnoni L.I. (2022) VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Argentina. 4 a 6 de octubre. Presentación formato poster.

✓“Compuestos de origen microbiano como estrategias de biocontrol de biofilms multiespecie formados en superficies de uso alimentario”. **Agustín, M.R.**, Tarifa M.C., Vela-Gurovic M.S, Brugnoni L.I. (2021) XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM) 2021. Paraguay. 26 a 29 de agosto. Presentación formato poster.

✓“Biofilm Formation on Ultrafiltration Membranes by Yeast Strains Isolated from Apple Juice Processing Industries”. **Agustín M.R.**, Tarifa María Clara, Brugnoni Lorena. International

Conference of Production Research-Americas (ICPR-Americas). Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. 9 al 11 de diciembre. Presentación oral. Publicado. ISBN 2619-1865.

✓“Efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 sobre *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* en jugo de manzana”. Tarifa M.C., **Agustín, M.R.**, Brugnoni L.I. (2018) VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria, Buenos Aires, Argentina, 25 al 27 de setiembre. Presentación formato poster.

✓ “Formación de biofilms duales de *Lactobacillus rhamnosus* con *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* O157:H7 en jugo de uva”. **Agustín, M.R.**, Brugnoni L.I. (2018) VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria, Buenos Aires, Argentina, 25 al 27 de setiembre. Presentación formato poster.

## ESTANCIAS Y PASANTIAS

Fecha: **09/12-2019**

Lugar: Department Chemie und Biologie, Universität Siegen, Alemania

Tipo de tareas: Tareas de investigación y desarrollo

Investigador responsable: Profesor Schönherr, Holger y Dra. Müller, Mareike.

Tema del plan: Investigación de estrategias de remoción de biofilms de *Pseudomonas* spp. sobre textiles.

### Resumen

Dado que los biofilms son resistentes a los procesos rutinarios de limpieza y desinfección, es necesario desarrollar enfoques más eficaces para contener los biofilms en los tejidos mediante diferentes estrategias preventivas y/o de reducción. El presente estudio propone un novedoso modelo de ensayo para el crecimiento y la eliminación de biofilms en tejidos del patógeno no patógeno *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, uno de los principales patógenos nosocomiales oportunistas. Para evaluar la remoción del biofilms se utilizaron tres formulaciones (F): 1) a base de detergente; 2) a base de enzima; 3) combinación de detergente y enzima (F1/2). Se analizaron mediante diferentes técnicas microscópicas (FE-SEM, SEM, 3D-laserscanning, microscopía de epifluorescencia), mediante microbalanza de cristal de cuarzo con monitorización de la disipación (QCM-D) y recuento en placa. Los resultados demostraron que ambas *Pseudomonas* spp. forman biofilms maduros sobre los sustratos de celulosa tejida, y que tras el tratamiento F1/2 se reducen significativamente ( $p < 0,001$ ) los recuentos de células viables de bacterias en los biofilms. Las imágenes de microscopía mostraron que tras el tratamiento con F1/2 se producía una clara disrupción de la estructura de los biofilms, sólo se observaron bacterias individuales adheridas a la superficie y compuestos residuales de la matriz de EPS. El mayor cambio de disipación de masa se observó tras aplicar la formulación F1/2 a las superficies cubiertas de biofilms, según las mediciones de QCM-D.

Los resultados obtenidos han sido publicados:

Monitoring Growth and Removal of *Pseudomonas* Biofilms on Cellulose-Based Fabrics. **Agustín, M.d.R.**; Stengel, P.; Kellermeier, M.; Tücking, K.-S.; Müller, M. *Microorganisms* **2023**, *11*, 892. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040892>