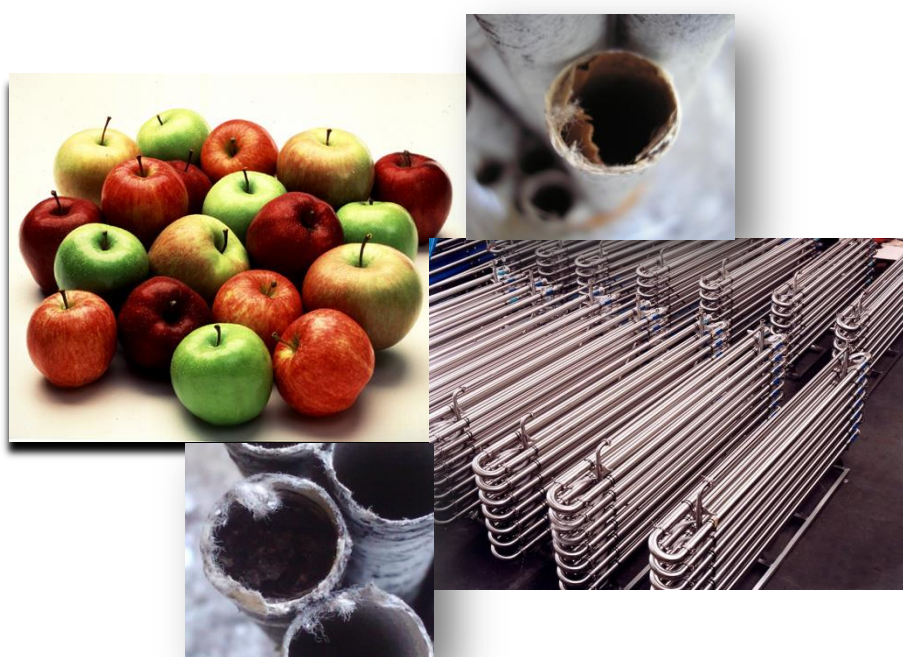




UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

**FORMACIÓN DE BIOFILMS EN SISTEMAS DE FILTRACIÓN
POR MEMBRANAS**



TARIFA MARÍA CLARA

BAHÍA BLANCA

2016

ARGENTINA



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

Formación de biofilms en sistemas de separación por membranas

Lic. Tarifa María Clara

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2016

PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar por el grado Académico de Doctor en Biología, 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 la Planta Piloto de Ingeniería Química (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 18 de septiembre de 2012 al 02 de diciembre de 2016, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Lozano, Profesor Titular de la Universidad Nacional del Sur e Investigador Principal del CONICET y la Dra. Lorena I. Brugnoli, Ayudante de Docencia Semi-exclusiva de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Adjunta del CONICET.”

Fecha: 02/12/2016



Lic. Tarifa María Clara



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el 27/ 03 / 2017, mereciendo la calificación de Sobresaliente 10 (Diez)

AGRADECIMIENTOS

❖ Al Dr. Jorge Lozano por haber aceptado la dirección de la presente Tesis Doctoral, por su ilimitado apoyo, su eterna disposición ante todo lo que necesité y por su buena predisposición ante las consultas realizadas, aún a pasos de su jubilación.

❖ A la Dra. Lorena I. Brugnoli por haber aceptado la co-dirección de la presente Tesis Doctoral y por seguir acompañándome en el camino de la ciencia. Por su ilimitado apoyo, sus constantes aportes a mis conocimientos académicos, por abrirme las puertas al mundo de la microbiología, y por su paciencia y cariño con el que me trató desde el primer día.

❖ A la Dra. María Amelia Cubitto del Laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos por aceptarme en su laboratorio, su excelente predisposición, por sus consejos y apoyo a lo largo de esta tesis.

❖ Al Ing. Facundo Iturmendi por haberme facilitado las muestras con las que trabajé, al personal de la empresa JUGOS S.A., una de las principales exportadoras de jugo concentrado de manzana y pera del país, por su excelente disposición y por facilitarnos el acceso a información que resultó de utilidad para la realización de esta tesis.

❖ Al Dr. Diego Genovese por su ayuda y asistencia a lo largo de las determinaciones reológicas, por su buena disposición y sus aportes que hicieron el trabajo interdisciplinario fructífero.

❖ Al Laboratorio de Levaduras del Departamento de Micología del INEI “Dr. Carlos G. Malbrán” por ayudarme en la identificación molecular de las levaduras, por los conocimientos que me dieron y la amabilidad con la que me trataron, en especial a la Bqca. Constanza Taverna.

❖ Al Laboratorio de Antifúngicos del Departamento de Micología del INEI “Dr. Carlos G. Malbrán” en especial a la Dra. Susana Córdoba por su ayuda y su buena predisposición ante mis dudas aún luego de mi pasantía en su laboratorio. También a Walter Vivot por su ayuda en las pruebas de sensibilidad que le realice a los aislamientos de levaduras.

❖ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca doctoral con la cual realice mi doctorado.

- ❖ A la Universidad Nacional del Sur por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de postgrado.
- ❖ A la Fundaciones Fulbright y Bunge-Born por haberme otorgado la beca de investigación doctoral que me permitió realizar una estadía en EE.UU.
- ❖ Al Dr. Phil Stewart del Center for Biofilm Engineering por aceptarme en su laboratorio y por compartir conmigo sus conocimiento y experiencia. A Betsey Pitts por su asistencia y compañía constante, junto con James.
- ❖ Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la UAT Bahía Blanca, a Viviana Sorrivias y a Cecilia Gutiérrez Ayesta por su asistencia técnica.
- ❖ Al servicio de Microscopía Confocal del INIBIBB en especial a Edgardo Buzzi por su asistencia técnica, por sus mates y su buena onda siempre a lo largo de muchas horas de microscopía.
- ❖ A mis papás por todo el esfuerzo que hicieron, la constante confianza que tuvieron en mí, por ser uno de los pilares más firmes de mi vida, y por enseñarme a ser la persona que soy.
- ❖ A los amigos que me dejó la universidad que aún a la distancia y después de muchos años me siguen acompañando.
- ❖ A los amigos que me fue dando la vida, de francés, anímate, tenis, aquellos que hice en mi estadía en Estados Unidos, y los que se fueron sumando.
- ❖ A mis amigas de Neuquén las cuales siempre estuvieron presente, aún en la distancia más larga.
- ❖ A las chicas y chicos del Laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos por compartir tantos buenos momentos, por ser los compañeros que fueron.
- ❖ A todas las personas del grupo de Alimentos de PLAPIQUI por su predisposición a ayudarme, por la amabilidad y cariño con el que me trataron siempre. Durante el doctorado tuve la suerte de conocer y trabajar con personas que me han ayudado en las distintas etapas y de distintas formas, y algunos se han convertido en grandes amigos.

RESUMEN

Inicialmente se presenta una introducción en donde se plantea un marco general de la actividad frutihortícola en el país relacionada a la producción de frutas de pepita (manzana y pera), junto con una breve descripción de los temas que se detallarán en los capítulos.

En el **Capítulo 1** se describe el aislamiento de microorganismos de módulos de ultrafiltración (UF) provenientes de una empresa productora y exportadora de jugo concentrado de manzana y pera. Se estudió la presencia de levaduras, mohos, bacterias lácticas y bacterias heterótrofas, mesófilas aerobias y/o anaerobias facultativas. Posteriormente se procedió al análisis de sus características de superficie, evaluándose la naturaleza química de la superficie celular. Además, se estableció la tasa de adhesión de cada una de las cepas aisladas sobre acero inoxidable y su correlación con la hidrofobicidad de la superficie celular a pH 4 (pH promedio del jugo de manzana).

En el **Capítulo 2** se presenta la adhesión y formación de biofilms mono y multiespecie. La habilidad de las levaduras residentes para colonizar los equipos de producción y formar biofilms en tiempos cortos determinaría una ventaja competitiva sobre otros microorganismos presentes en el sistema y les permitiría sobrevivir a los procedimientos de limpieza y desinfección. Debido a que la situación más frecuente en las industrias alimentarias es la formación de comunidades multiespecie sobre las superficies, y dado que las mismas están reguladas por diferentes relaciones inter e intra específicas, se planteó el estudio de biofilms mixtos levadura/bacteria.

En el **Capítulo 3** se plantean los ensayos realizados sobre membranas de UF del mismo material y con las mismas características y puntos de corte que las utilizadas en las industrias para la clarificación de jugos. Estos ensayos fueron efectuados en unidades de filtración por membrana de flujo transversal a escala laboratorio. Posteriormente se procedió al estudio de estrategias de control mediante secuencias de limpieza y desinfección en condiciones de flujo variable, utilizando soluciones de hipoclorito de sodio, desinfectante comúnmente empleado en las industrias alimentarias en general y jugueras en particular.

En el **Capítulo 4** se determinaron las propiedades viscoelásticas lineales de biofilms mixtos de *Candida krusei*, *C.tropicalis*, *C.kefyr* y *Rhodotorula mucilaginosa*, todas ellas aisladas de membranas de UF (Capítulo 1). Se analizaron diferencias en función de la concentración de jugo (6 y 12 °Brix), del tipo de jugo de fruta (manzana y pera) y de la hidrodinámica de los fluidos (estático y turbulento). Se realizaron análisis sobre la

formación y composición de los biofilms además de la reología de los mismos. Los ensayos mencionados se efectuaron directamente sobre las superficies de acero inoxidable mediante el diseño en nuestro laboratorio de un adaptador universal para la fijación de distintas superficies de uso industrial y medición de las propiedades reológicas del biofilm sin distorsionarlo, los pocos estudios realizados involucran por lo general la remoción del biofilm, no existiendo prácticamente ensayos reológicos *in situ*. Por último, se presentan las **Conclusiones generales** y se adjunta además dos anexos: **Anexo 1: Técnicas microscópicas** y **Anexo 2: Biofilms duales**, donde se compilan las imágenes de SEM obtenidas a partir de los ensayos del Capítulo 2.

ABSTRACT

First, an introduction is given with a framework of the fruit production of pome fruits (apple and pear) in Argentina, together with a brief summary of the main topics of each chapter.

Chapter 1 includes a description of the microorganisms isolated from ultrafiltration (UF) modules used in a large-scale apple juice processing industry; the presence of yeasts, molds, lactic acid bacteria and heterotrophic, aerobic, mesophilic and / or facultative bacteria were studied. Afterwards, we analyzed the cell surface characteristics of the isolates through the evaluation of the chemical nature of its cell surface. Also, in the same chapter a description of the adhesion rate of each strain was done on stainless steel together with the correlation of the cell surface hydrophobicity at pH 4 (average pH of apple juice).

Next, in **Chapter 2** we present a study of mono and multi specie adhesion and biofilm formation. The ability of yeasts, common members of apple juice industries, to colonize manufacturing equipment and to form biofilms in short periods of times could render in a competitive advantage over other microorganisms present in the system, allowing them to survive cleaning and disinfection procedures. Due to the fact that the most common situation in food industries is the formation of multispecies biofilms, and because they are regulated by many inter and intra specific relations, is that we contemplated the formation of mixed yeast/bacteria biofilms.

In **Chapter 3** we carried out assays on UF membranes of the same material and molecular cut-off as the ones used for the clarification of apple juice. These tests were done on cross-flow filtration units at a laboratory scale. Subsequently, control strategies were analyzed using cleaning and disinfection sequences under variable flow conditions using solutions of sodium hypochlorite, the most commonly used disinfectant in food industries.

In **Chapter 4**, lineal viscoelastic properties of mixed biofilms of *Candida krusei*, *C.tropicalis*, *C.kefyr* and *Rhodotorula mucilaginosa* (all of them isolated from UF membranes, Chapter 1) were measured. Differences were analyzed according to juice concentration (6 and 12 ° Brix), type of juice (apple and pear) and fluid hydrodynamics (static and turbulent). Analyzes were made on the formation and composition of the biofilms in addition to the rheology. The aforementioned tests were carried out directly on stainless steel; the disks with the biofilms on top were attached to the rheometer's

lower plate by means of a special ring designed *ad hoc*. Then the rheological properties of the biofilm were measured without disturbing it. Most studies usually involve the removal of the biofilm but only few do it *in situ*.

Finally, **General Conclusions** are presented and two annexes: **Annex 1**: Microscopic techniques and **Annex 2**: Dual Biofilms, where the SEM images obtained from the tests of Chapter 2 are compiled.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Referencias bibliográficas	11
CAPÍTULO 1	
Aislamiento, caracterización fisicoquímica y adhesión de microorganismos	
1. Introducción	17
Objetivos generales y específico	20
2. Materiales y métodos	21
2.1 Sistema de estudio	21
2.2 Toma de muestras	22
2.3 Aislamiento de microorganismos	23
2.3.1 Aislamiento de <i>Bacterias Heterótrofas Totales y Enterobacterias</i>	23
2.3.2 Aislamiento de <i>Bacterias ácido lácticas (BAL)</i>	23
2.3.3 Aislamiento de hongos	24
2.4 Composición del jugo de manzana	25
2.5 Caracterización fisicoquímica de la superficie celular de las cepas aisladas	26
2.6 Ensayos de adhesión sobre acero inoxidable	28
2.7 Análisis estadístico	30
3. Resultados	31
3.1 Aislamiento de microorganismos	31
3.2 Ensayo de Adhesión Microbiana a Solventes (Microbial Adhesion to Solvents, MATS)	32
3.3 Adhesión y colonización	39
4. Discusión	44

4.1 Aislamiento de microorganismos	44
4.2 Propiedades fisicoquímicas: MATS	46
4.3 Adhesiones levadura-acero inoxidable	48
5. Referencias bibliográficas	52

CAPÍTULO 2

Formación de biofilms

1. Introducción	61
Objetivos generales y específico	65
2. Materiales y métodos	66
2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	66
2.2 Ensayos de supervivencia de bacterias patógenas en jugo de manzana	67
2.3 Pre-adaptación de las bacterias patógenas en jugo de manzana	67
2.4 Ensayos de co-agregación y auto-agregación	68
2.5 Formación de biofilms multiespecie	69
2.5.1 <i>Ensayos de adhesión levadura-bacteria</i>	69
2.6 Análisis estadístico	71
3. Resultados	73
3.1 Ensayo de supervivencia de bacterias patógenas en jugo de manzana	73
3.2 Ensayos de agregación	73
3.3 Formación de biofilms	75
3.3.1 <i>Adhesiones: mono cultivos bacterias - levaduras</i>	76
3.3.2 <i>Adhesiones: cultivos mixtos bacterias – levaduras</i>	82
4. Discusión	90
5. Referencias bibliográficas	98

CAPÍTULO 3

Formación de biofilms sobre membranas de ultrafiltración-Estrategias de control

1. Introducción	107
Objetivos generales y específico	112
2. Materiales y métodos	113
2.1 Ensayos de desinfección sobre células planctónicas	113
2.2 Ensayos de desinfección sobre células adheridas	113
2.3 Ensayos de desinfección sobre células adheridas a membranas de UF en condiciones de flujo variable	115
2.3.1 <i>Protocolo de limpieza y desinfección</i>	117
2.4 Análisis estadístico	118
3. Resultados	119
3.1 Ensayos de desinfección sobre células planctónicas	119
3.2 Ensayos de desinfección sobre células adheridas	120
3.3 Ensayos de adhesión en sistemas de filtración por membrana	123
3.4 Protocolo de limpieza y desinfección	125
4. Discusión	133
5. Referencias bibliográficas	138

CAPÍTULO 4

Reología

1. Introducción	143
Objetivos generales y específico	149

2. Materiales y métodos	150
2.1 Matriz líquida de estudio (medio de cultivo)	150
2.2 Reología: Formación de biofilms bajo condiciones estáticas	151
2.3 Reología: Formación de biofilms bajo condiciones dinámicas	152
2.4 Análisis microbiológico	154
2.5 Mediciones reológicas	154
2.6 Análisis estadístico	156
3. Resultados	157
3.1 Análisis microbiológico	157
3.2 Mediciones reológicas	161
4. Discusión	165
5. Referencias bibliográficas	171
CONCLUSIONES GENERALES	178
ABREVIACIONES	181
ANEXO 1	182
1.1 Microscopia de epifluorescencia (ME) y Microscopía de láser confocal (CLSM)	182
1.1.1 <i>Microscopía de epifluorescencia</i>	182
1.1.2 <i>CLSM</i>	183
1.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	183
ANEXO 2	184

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Argentina es la primera exportadora de peras del Hemisferio Sur y la quinta en manzanas a nivel mundial (CAFI). Del total de la producción mundial, el 30% de manzana se destina a la industria de la cual la mitad se muele para jugo concentrado; en cambio sólo el 10% de la producción mundial de pera se industrializa, teniendo como principal subproducto las conservas seguido por los jugos concentrados (Bruzone 2008). El Alto Valle de Río y Neuquén, ubicado en la región norte de la Patagonia, es una región frutícola intensiva productora de frutas de pepita (peras y manzanas), de frutales de carozo y uvas. Dentro de su producción en el país, el 85 % corresponde a manzana y el 75% a pera, el resto se genera en el Valle de Uco (Mendoza), 25 de Mayo (La Pampa) y el Valle del Tulum (San Juan), entre otros (Bevilacqua y Storti 2011). Para sustentar esta actividad cuenta con un amplio polo agroindustrial que respalda los diversos sectores asociados, tales como empaque y conservación de la fruta fresca, como así también la producción de jugos de fruta y vinos para el aprovechamiento de la fruta de descarte. Las manzanas (o peras) rechazadas por los criterios de selección para el mercado de consumo son las utilizadas para la producción de jugo concentrado. El jugo es un producto fuertemente orientado al mercado de exportación destinándose para esto el 95% de la producción, constituyendo así un *commodity* de bajo valor agregado que mayormente se vende a granel para ser utilizado como insumo por otras industrias alimenticias, como por ejemplo endulzante para las compañías elaboradoras de bebidas gaseosas en el caso del jugo de manzana, mientras que el de pera es utilizado preferentemente para elaborar jugos de consumo directo.

De acuerdo a lo establecido por la FDA y col. (2004), se puede definir al jugo como un líquido acuoso obtenido de una o más frutas y/o vegetales o cualquier concentrado de dicho líquido; mientras que el jugo concentrado es aquel que una vez extraído de la fruta y/o vegetal sufre un proceso de reducción en peso y volumen a través de la remoción de la porción acuosa. La mayoría de los jugos procesados se elaboran con frutas ácidas y se venden como concentrados congelados, pasteurizados y/o refrigerados. El jugo de frutas contiene un 100 % de los componentes de la misma, mientras que los concentrados se definen en función del contenido de fruta, y éste varía según las normativas vigentes en cada país (Arthey y Ashurst 1996). Los jugos de manzana son bebidas ácidas (pH 3 a 4) con alto contenido de azúcar (~ 12 °Brix). En estas condiciones, bacterias lácticas, mohos y levaduras forman parte de la microbiota

típicamente encontrada. Las bacterias lácticas 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. Por otro lado, los mohos y las levaduras toleran mejor estas condiciones además de tolerar altas presiones osmóticas, bajo pH y crecer a temperaturas de refrigeración; transformándolas en las principales responsables del deterioro del producto ya procesado (Swanson 1989; Querol y Fleet 2006; Tournas y col. 2006).

La fuerte inserción en el mercado externo como uno de los principales exportadores de EE.UU y Europa explica por qué Argentina ha alcanzado niveles similares al de los países con estructuras productivas eficientes, debido entre otras cosas a la inversión realizada en modernas tecnologías que implicaron mayores niveles de productividad, calidad y uniformidad de los productos.

Dentro del proceso productivo del jugo, ya sea concentrado o no, los procesos de separación por membrana son ampliamente utilizados en las plantas procesadoras. Entre estos, la ultrafiltración (UF) y la nanofiltración (NF) son las más utilizadas en la industria de los alimentos en general y en la clarificación de jugos de fruta en particular, usándose sistemas de filtración tangencial donde la fuerza impulsora proviene de la diferencia de presión, resultando así en la separación y/o concentración de las partículas disueltas o suspendidas (Hernández y col. 1990). La utilización de estas técnicas no sólo es de interés en la producción de jugos sino que también permite la obtención de esencias y aromas, lo que resulta de gran importancia en este tipo de industrias.

El principio en la utilización de membranas es simple: la membrana actúa como un filtro muy específico que dejará pasar el agua u otro líquido a filtrar, funciona como una barrera de separación selectiva en donde los sólidos suspendidos y otras sustancias no atraviesan la membrana quedando retenidos; esto dependerá del tamaño de poro de la membrana a utilizar. Hay varios métodos para permitir que las sustancias atraviesen una membrana: la aplicación de alta presión, el mantenimiento de un gradiente de concentración en ambos lados de la membrana o la introducción de un potencial eléctrico. Hay dos factores que determinan la efectividad de un proceso de filtración de membrana: selectividad y productividad. Ambos dependen de la membrana empleada (González y de la Macorra García 2014):

- La selectividad se expresa mediante un parámetro llamado factor de retención o de separación (expresado en $l/m^2 h$).

- La productividad se expresa mediante un parámetro llamado flujo (expresado en $\text{l/m}^2 \text{ h}$). La selectividad y la productividad dependen de la membrana.

El tipo de membrana que se escoge es un factor importante para garantizar un buen funcionamiento y un óptimo rendimiento del proceso. Existen diversas clases de membranas que se adaptan a diferentes aplicaciones según cuál sea el nivel de filtrado requerido. Las membranas en espiral, las membranas cerámicas, las membranas tubulares, las membranas de fibra hueca y las membranas “*plate & frame*” son los modelos más habituales. En el proceso productivo de jugos clarificados se utilizan generalmente membranas tubulares las cuales son altamente resistentes a ocluirse al procesar corrientes con grandes cantidades de sólidos en suspensión y/o componentes fibrosos.

Dentro de las ventajas de la utilización de membranas está la preservación de la calidad, minimizando el riesgo de daño de los alimentos termolábiles así como la pérdida de aromas (no se requiere la utilización de calor), menores requerimientos energéticos (en comparación con procesos convencionales como la evaporación y la concentración) y no requieren la utilización de grandes cantidades de agua para el enfriamiento de equipos, siendo consideradas tecnologías “amigables” con el medio ambiente.

En las industrias productoras de jugos de fruta, particularmente, las técnicas de filtración por membranas han resultado de mucha utilidad en la clarificación (Hernández y col. 1990). La UF produce jugos libres de sedimentos y turbidez, ahorrando costos operacionales y materiales, los rendimientos de producción son mayores y se reducen los productos de desecho aumentando la calidad del producto (organoléptica y microbiológica) (Scott 1995). Industrialmente, la filtración se conduce casi exclusivamente de forma tangencial para minimizar las resistencias a la filtración. Productos de valiosas propiedades funcionales y nutricionales para la industria alimentaria junto con antioxidantes naturales son recuperados y purificados por estas tecnologías de membranas.

A lo largo de los ciclos de producción se va depositando sobre las superficies de las membranas material que puede ser de origen inorgánico, orgánico y/o biológico llevando a un proceso de ensuciamiento o *fouling*. El ensuciamiento biológico (Flemming 1997, 2002), *biofouling*, es el problema más grave que sufren estos sistemas, causando pérdidas severas en el rendimiento, modificando sus propiedades de superficie y demandando la implementación de costosos programas de limpieza o directamente su reemplazo (Baker y Dudley 1998; Nagaoka y col. 1998; Pan y col. 2010).

En el contexto de la UF y NF, los biofilms formados no pueden ser removidos completamente en forma mecánica por retrolavado. Esto implica que deben utilizarse también métodos químicos de limpieza, los cuales recuperan por lo general las propiedades hidráulicas de las membranas pero tienen poco impacto en la composición y organización del material depositado (Di Martino y col. 2007).

El comportamiento más común que adoptan los microorganismos tanto en sistemas naturales como industriales es la formación de biofilms, estimándose que un 99% de los microorganismos se encuentran adheridos a una superficie (Characklis 1973; Dalton y March 1998; Sanclement y col. 2005; Garrett y col. 2008). En un principio, el estudio de los biofilms estuvo asociado al proceso de biofouling (Characklis 1973; Characklis 2009) definiéndose a los biofilms como comunidades de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido (Costerton y col. 1987). Estudios posteriores, con técnicas más avanzadas permitieron a Donlan (2002) efectuar una descripción más amplia de los mismos, estableciendo que es “una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido y que exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica”. La adhesión microbiana a superficies y posteriormente el desarrollo de biofilms han sido reportados en gran variedad de ambientes desde naturales, industriales y médicos. Los biofilms constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que le permite a los microorganismos sobrevivir en ambientes hostiles, siendo su comportamiento y fisiología significativamente diferentes de aquellos microorganismos que crecen en medio líquido. Su presencia trae como consecuencia una importante y variada cantidad de problemas tanto en el ámbito médico (infecciones), las industrias en general (biocorrosión, pérdida de rendimiento) y la industria alimentaria en particular (contaminación microbiana de alimentos) además del biodeterioro de patrimonios culturales, entre otros. Cabe aclarar también que los biofilms también están relacionados a procesos beneficiosos (biolixiviación, biorremediación, biocontrol, etc.) (Morikawa 2006; Diaz 2011).

La formación de biofilms es el resultado de diferentes procesos, químicos, físicos y biológicos que ocurren simultáneamente bajo ciertas condiciones ambientales. Es un proceso que incluye en primer lugar un contacto primario de las células con la superficie a colonizar, seguido de la adhesión y la formación del biofilm. La etapa de adhesión es un proceso multifactorial clave, donde hay un primer estadio reversible que está

condicionado por fuerzas de largo alcance (fuerzas atractivas de van der Waals, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas), seguido de uno irreversible donde se dan interacciones de corto alcance (interacciones dipolo-dipolo, uniones hidrógeno, covalentes y no covalentes e interacciones hidrofóbicas). Los microorganismos ya adheridos comienzan a secretar una matriz extracelular que les sirve de anclaje y protección. El desprendimiento de los biofilms es también un factor determinante a tener en cuenta, ya que es un proceso primario que balancea su crecimiento (Van Loosdrecht y col. 1997) generando un riesgo potencial de contaminación de los productos.

La formación del biofilm puede ocurrir por al menos tres mecanismos. Uno de ellos es la división binaria de las células adheridas (Heydorn y col. 2000). El segundo mecanismo es la redistribución de las células adheridas mediante la movilidad superficial (Dalton y col. 1996). Es decir, a medida que las células se dividen las células hijas se desplazan sobre la superficie para formar cúmulos celulares de manera similar a lo que ocurre en la formación de colonias en las placas de agar. Un tercer mecanismo de agregación es la captación de células planctónicas a partir del fluido y hacia el biofilm desarrollado (Stoodley y Lewandowski 1994; Tolker-Nielsen y col. 2000). La contribución relativa de estos tres mecanismos depende de los organismos involucrados, la naturaleza de la superficie colonizada y las condiciones físicas y químicas del medio ambiente, e impacta sobre la estructura del biofilm.

Si bien se pensaba que la formación de los biofilms comenzaba con una primera etapa de aproximación microorganismo-sustrato, en la mayoría de los casos, el transporte de masa está antecedido por la adsorción de una fina película orgánica que se va depositando sobre el sustrato (Schneider y Marshall 1994). La materia orgánica presente en el medio se deposita sobre las superficies y forma lo que se conoce como “capa acondicionante” (*conditioning layer*), cambiando las propiedades químicas y físicas de la interfase superficie/fluido y tornándola más amigable para la adhesión. Una segunda etapa consta de la adhesión reversible de los microorganismos, en donde las células aún son capaces de abandonar la superficie y volver a su forma planctónica. Para poder pasar a la próxima fase de adhesión irreversible deben ser capaces de superar la repulsión neta entre la superficie celular y el sustrato sobre el cual quieren adherirse. La transición entre unión reversible e irreversible se produce por la evolución de interacciones débiles célula/sustrato a enlaces permanentes, frecuentemente mediados por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares en el caso por ejemplo de

bacterias (Stoodley y col. 2002b). Una vez adheridas las células, comienza la formación del biofilm y la formación de una matriz polimérica extracelular (EPS) compuesta entre otras cosas por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Marshall y col. 1971; Lappin-Scott y Costerton 2003; Thomas y Nakaishi 2006; Tournu y Van Dijck 2011). La siguiente etapa, la maduración, está conformada por un balance entre la multiplicación de los microorganismos y el desprendimiento para la propagación y colonización de nuevos lugares, y es lo que termina cerrando el ciclo. Una vez que los biofilms alcanzan su madurez, se puede observar la estructura típica dada por espacios intercelulares o canales que variarán de acuerdo a las condiciones del medio en el que se desarrollen. A su vez comienzan a darse diferentes tipos de comunicaciones inter e intra especie que van moldeando la estructura de biofilm y que les permite un cierto grado de coordinación (Shirtliff y col. 2009). Posteriormente, el proceso de desprendimiento proporcionaría los mecanismos para que los microorganismos se distribuyan sobre las superficies, de manera de ampliar la colonización del ambiente en donde se están formando, logrando así formar nuevos biofilms en sitios distantes. Estos procesos no necesariamente se encuentran sincronizados sino que puede ocurrir que diferentes regiones del biofilm estén en distintos estadios del desarrollo.

La comunicación célula-célula ejerce también un marcado impacto sobre las distintas etapas del desarrollo del biofilm. Los microorganismos utilizan una amplia variedad de mecanismos para comunicarse entre ellos (Leriche y col. 2003; De Sordi y Mühlischlegel 2009; Giaouris y col. 2015). Esta interacción le permite a los microorganismos dentro de los biofilms comunicarse entre ellos permitiendo un comportamiento sincronizado de todos los miembros del grupo y por lo tanto actuar como un organismo pluricelular (Nikolaev y Plakunov 2007). Ciertos autores (Donlan 2002; Singh y col. 2002; Post y col. 2004) han planteado que a menos que en las inmediaciones de las células se encuentre un número adecuado de otras células, los costos de producción de un biofilm sobrepasan los beneficios individuales.

Para desarrollar estrategias capaces de erradicar los biofilms es necesario analizar previamente los mecanismos de resistencia que los caracterizan. En el caso de los microorganismos en forma planctónica, la resistencia es la habilidad de los mismos para crecer en presencia de una elevada concentración de un biocida, o el aumento en la concentración mínima inhibitoria (CIM). Dentro de los mecanismos de resistencia en los biofilms podemos encontrar:

- Penetración reducida del agente biocida y/o degradación del mismo.
- Disminución de la tasa de crecimiento.
- Cambios fenotípicos, a través por ejemplo de una expresión diferencial de enzimas.

El paso posterior teniendo todo esto en cuenta es la búsqueda de enfoques novedosos para el tratamiento y su prevención en ambientes industriales. Uno de los factores que se marcaron como característicos de los biofilms fue la organización de sus “habitantes” en comunidades, una alternativa es desarrollar estrategias para impedir la formación de su estructura compleja; si la multicelularidad del biofilm es inhibida, es posible que los protocolos de desinfección puedan ser capaces de combatirlos satisfactoriamente. Otra opción es la utilización de enzimas que ataquen la matriz de exopolisacáridos que los protege y/o que interfieran con la comunicación célula-célula (Stewart y Costerton 2001). También se utiliza la modificación de las superficies, en el caso del ámbito industrial, a través de diferentes revestimientos que modifican por ejemplo, la hidrofobicidad del mismo.

Uno de los grandes problemas que sufren las membranas es la formación indeseable de depósitos sobre sus superficies, *fouling*, lo que resulta en la disminución del flujo y/o aumento de la caída de presión durante la filtración (Flemming 1997; 2002).

La eliminación de aquellos microorganismos establecidos en un biofilms es más compleja y problemática que la remoción de los mismos en su forma libre ya que la inclusión en estas comunidades les confiere una resistencia mayor a los procesos de limpieza y desinfección (Costerton y col. 1999; Brugnoli y col. 2012), punto de especial cuidado en lo que respecta a las industrias productoras de alimentos. A este hecho se le suma que muchos de los equipos de estas plantas son de difícil acceso (cañerías, módulos de filtración). Si esto lo trasladamos a los sistemas de UF, sumado a la complejidad de los biofilms *per se*, se suma el agravante de la topografía en donde tenemos superficies porosas.

Uno de los tópicos que en los últimos años ha tomado auge dentro del estudio de los biofilms y su comportamiento, son sus propiedades mecánicas, aceptándose que los mismos pueden ser considerados como polímeros biológicos. A través de la reología se puede estudiar la deformación y flujo de la materia (Steffe 1996). La viscoelasticidad es la propiedad de los materiales que presentan comportamiento viscoso y elástico cuando son sometidos a deformaciones; el comportamiento elástico es típico de los sólidos,

mientras que el comportamiento viscoso es típico de los fluidos (Goodwin y Hughes 2008).

El primer estudio de las propiedades mecánicas de un *biofilm* fue realizado por Characklis (1980), y en los últimos años los mismos han ido en aumento, aunque en su mayoría se han estudiado aquellos formados por bacterias (Rogers y col. 2008; Pavlovsky y col. 2013; Hollenbeck y col. 2014; Pavlovsky y col. 2015; Persat y col. 2015; Tierra y col. 2015).

Cuando los biofilms son sometidos a una fuerza, tienen un comportamiento elástico durante cortos períodos de tiempo (segundos) existiendo una relación no lineal entre la fuerza aplicada y la deformación resultante, mientras las deformaciones sean reversibles. A altas deformaciones, los biofilms muestran un comportamiento viscoelástico resistiendo fuerzas aplicadas pero mostrando una deformación irreversible (Körstgens y col. 2001a; b; Stoodley y col. 2002a; Towler y col. 2003; Shaw y col. 2004). La medición de las propiedades mecánicas de los biofilms y la interpretación de los resultados son dos hechos complicados debido a la heterogeneidad estructural y biológica de los mismos, generalmente conteniendo a su vez múltiples especies de microorganismos y complejas redes de canales y vacíos. En general, las propiedades mecánicas de un biofilm determinan su deformación debido a una fuerza aplicada, tal como el *shear* que se origina en el flujo sanguíneo o urinario. La resistencia es uno de los parámetros utilizados para describir las propiedades mecánicas.

Todas estas circunstancias pueden incrementar las capacidades de supervivencia de los microorganismos en los sistemas industriales. Dentro de los objetivos generales en cuanto al control microbiano ya sea en las industrias como en cualquier ámbito que se lo requiera, es prevenir el deterioro de los productos y asegurar de esa manera que los mismos cumplan con las especificaciones marcadas por el mercado o las legislaciones. Entre los medios más importantes para mantener un control sobre esto están: (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 (Wirtanen y col. 2000).

El cloro es uno de los compuestos de más amplio uso en las industrias productoras de alimentos debido a su bajo costo, facilidad de aplicación y amplio espectro de eficacia (Ramos y col. 2013). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias presenta desventajas como una limitada eficiencia en la reducción de las cargas microbianas (Yaron y Römling 2014) ya que por ejemplo puede ser fácilmente inactivado por la materia

orgánica (Parish y col. 2003; Ramos y col. 2013), además su acción es altamente dependiente del pH. Entre los subproductos que se pueden formar cuando reaccionan con moléculas orgánicas están compuestos clorados carcinógenos y mutagénicos, tales como cloroformo y otros trihalometanos, cloraminas y ácidos haloacéticos (Legay y col. 2010; Bull y col. 2011). A pesar de esto, el hipoclorito de sodio es el compuesto más utilizado para la desinfección de las distintas superficies industriales, en especial en los equipos cerrados (White 2010).

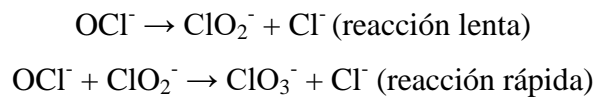
Hay otras alternativas que se han desarrollado para reducir y/o reemplazar el uso de cloro, entre los que se encuentran métodos biológicos, compuestos químicos alternativos y tecnologías físicas, o incluso la combinación de todos estos métodos (Gil y col. 2009; Ölmez y Kretzschmar 2009; Xuetong y col. 2009; Otto y col. 2011; Bilek y Turantaş 2013; Goodburn y Wallace 2013; Holah 2014). La mayoría de estos métodos detallados en las publicaciones citadas, son reconocidos como “amigables” con el medio ambiente y no representan un riesgo potencial para la salud y la seguridad de los trabajadores y consumidores. Cualquiera sea el compuesto que se utiliza hay que tener en cuenta que el agente biocida que se utilice tiene que interactuar con su objetivo en este caso los microorganismos dentro del biofilm (McMurry y col. 1998).

La fabricación de hipoclorito de sodio es un procedimiento sencillo que implica la reacción del cloro con soda cáustica en un proceso discontinuo o continuo (Gordon y col. 1995), cuya reacción es la siguiente:

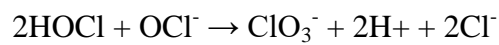


La efectividad de las soluciones de este compuesto se expresan generalmente en términos de su contenido de cloro libre, la cual en agua puede estar dada por la concentración del Cl en su forma molecular (Cl_2), ácido hipocloroso (HCl) o ión hipoclorito (OCl^-) (Haas 1999). La estabilidad de las soluciones de hipoclorito de sodio se ve afectada por factores tales como concentración, luz, pH, temperatura y metales pesados. A menudo se observa una reducción de la efectividad con el aumento en la concentración del ión hipoclorito, la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Casson y Bess 2003). La lavandina líquida (NaClO) tiene un pH en general de entre 11 y 13, en una solución básica el ión hipoclorito (OCl^-) se descompone para formar ión clorato (ClO_3^-) (subproducto tóxico). En una reacción de segundo orden se da la

reacción de OCl^- con el ión OCl_2^- (un ion intermedio) en la siguiente reacción (Bolyard y col. 1992):



Si se disminuye el pH de la solución se acelera la formación del ión ClO_3^- y el pH de la solución de OCl^- sigue disminuyendo a lo largo del tiempo. Esto está representado por la siguiente reacción (Gilbert y col. 1997):



Este es un marco general que introduce la problemática de los biofilms en las industrias alimentarias, concluyendo que es necesario entender su mecánica de formación y cómo evolucionan para poder diseñar estrategias acordes para su control de forma integral con las necesidades de las industrias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arthey, D. y Ashurst, P. R. (1996). *Procesado de frutas*. Zaragoza, Editorial Acribia, 288 p.
- Baker, J. y Dudley, L. (1998). "Biofouling in membrane systems—a review." *Desalination* **118**(1): 81-89.
- Bevilacqua, M. y Storti, L. (2011). *Complejo Frutícola: Manzana y Pera. Producción Regional por Complejos Productivos*, Ministerio de Haciendo y Finanzas Públicas.
- Bilek, S. E. y Turantaş, F. (2013). "Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review." *International Journal of Food Microbiology* **166**(1): 155-162.
- Bolyard, M., Fair, P. S. y Hautman, D. P. (1992). "Occurrence of chlorate in hypochlorite solutions used for drinking water disinfection." *Environmental Science & Technology* **26**(8): 1663-1665.
- Brugnoni, L. I., Cubitto, M. A. y 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.
- Bruzzone, I. (2008). "Manzana y pera." Disponible en http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/47/cadenas/r47_05_ManzanaPera.pdf.
- Bull, R. J., Reckhow, D. A., Li, X., Humpage, A. R., Joll, C. y Hrudey, S. E. (2011). "Potential carcinogenic hazards of non-regulated disinfection by-products: haloquinones, halo-cyclopentene and cyclohexene derivatives, N-halamines, halonitriles, and heterocyclic amines." *Toxicology* **286**(1): 1-19.
- CAFI. "Cámara Argentina de Fruticultores Integrados." Disponible en <http://www.cafi.org.ar/nuestra-produccion/>.
- Casson, L. W. y Bess, J. W. (2003). *Conversion to on-site sodium hypochlorite generation: water and wastewater applications*. Nueva York, EE.UU, Lewis publishers, 224 p.
- Costerton, J. W., Cheng, K., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. y Marrie, T. J. (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease." *Annual Reviews in Microbiology* **41**(1): 435-464.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. y Greenberg, E. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* **284**(5418): 1318-1322.
- Characklis, W. (1980). *Biofilm development and destruction*. Final report. Electric Power Research Institute. Palo Alto, CA, EE.UU. .
- Characklis, W. (2009). "Fouling Biofilm Development: A Process Analysis." *Biotechnology and Bioengineering* **102**(2): 310-347.
- Characklis, W. G. (1973). "Attached microbial growths—II. Frictional resistance due to microbial slimes." *Water Research* **7**(9): 1249-1258.

Dalton, H., Goodman, A. y Marshall, K. (1996). "Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria." *Journal of Industrial Microbiology* **17**(3-4): 228-234.

Dalton, H. M. y March, P. E. (1998). "Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling." *Current Opinion in Biotechnology* **9**(3): 252-255.

De Sordi, L. y 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.

Di Martino, P., Doumeche, B., Galas, L., Vaudry, H., Heim, V. y Habarou, H. (2007). "Assessing chemical cleaning of nanofiltration membranes in a drinking water production plant: a combination of chemical composition analysis and fluorescence microscopy." *Water Science and Technology* **55**(8-9): 219-225.

Díaz, C. (2011). Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie, Facultad de Ciencias Exactas.

Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." *Emerging Infectious Diseases* **8**(9): 881-890.

FDA, U., Food y Administration, D. (2004). "Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition; Final Guidance." *Guidance and Regulation*.

Flemming, H.-C. (1997). "Reverse osmosis membrane biofouling." *Experimental Thermal and Fluid Science* **14**(4): 382-391.

Flemming, H.-C. (2002). "Biofouling in water systems—cases, causes and countermeasures." *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**(6): 629-640.

Garrett, T. R., Bhakoo, M. y Zhang, Z. (2008). "Bacterial adhesion and biofilms on surfaces." *Progress in Natural Science* **18**(9): 1049-1056.

Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Mørretrø, T., Langsrud, S., y col. (2015). "Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens." *Frontiers in microbiology* **6**(1): 26.

Gil, M. I., Selma, M. V., López-Gálvez, F. y Allende, A. (2009). "Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions." *International Journal of Food Microbiology* **134**(1): 37-45.

Gilbert, G., Adam, L. C., Bubnis, B. P. y Kuo, C. (1997). "Predicting liquid bleach decomposition." *American Water Works Association. Journal* **89**(4): 142.

González, M. T. D. y de la Macorra García, C. (2014). "Utilización de membranas como tratamientos terciarios para regeneración de aguas residuales: membranas cerámicas." *Tecnología y desarrollo* (12): 4.

Goodburn, C. y Wallace, C. A. (2013). "The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: a review." *Food Control* **32**(2): 418-427.

- Goodwin, J. W. y Hughes, R. W. (2008). *Rheology for chemists: an introduction*. London, Royal Society of Chemistry, 49 p.
- Gordon, G., Adam, L. y Bubnis, B. (1995). "Minimizing chlorate ion formation." *Journal-American Water Works Association* **87**(6): 97-106.
- Haas, C. (1999). *Disinfection. Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies* (RD Letterman, editor), McGraw-Hill, New York.
- Hernández, A., Tejerina, F., Arribas, J., Martínez, L. y Martínez, F. (1990). *Microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa*. Madrid, España, EDITUM. **4**, 129 p.
- Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B. K. y Molin, S. (2000). "Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT." *Microbiology* **146**(10): 2395-2407.
- Holah, J. (2014). "Cleaning and disinfection practices in food processing-9." *Hygiene in Food Processing (Second Edition)*: 259-304.
- Hollenbeck, E. C., Fong, J. C., Lim, J. Y., Yildiz, F. H., Fuller, G. G. y Cegelski, L. (2014). "Molecular determinants of mechanical properties of *V. cholerae* biofilms at the air-liquid interface." *Biophysical Journal* **107**(10): 2245-2252.
- Körstgens, V., Flemming, H.-C., Wingender, J. y Borchard, W. (2001a). "Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*." *Water Science and Technology* **43**(6): 49-57.
- Körstgens, V., Flemming, H.-C., Wingender, J. y Borchard, W. (2001b). "Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms." *Journal of Microbiological Methods* **46**(1): 9-17.
- Lappin-Scott, H. M. y Costerton, J. W. (2003). *Microbial biofilms*. Cambridge, Reino Unido, Cambridge University Press. **5**, 328 p.
- Legay, C., Rodriguez, M. J., Sérodes, J. B. y Levallois, P. (2010). "Estimation of chlorination by-products presence in drinking water in epidemiological studies on adverse reproductive outcomes: a review." *Science of the total environment* **408**(3): 456-472.
- Leriche, V., Briandet, R. y Carpentier, B. (2003). "Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another." *Environmental Microbiology* **5**(1): 64-71.
- Marshall, K., STOUT, R. y Mitchell, R. (1971). "Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces." *Microbiology* **68**(3): 337-348.
- McMurry, L. M., Oethinger, M. y Levy, S. B. (1998). "Triclosan targets lipid synthesis." *Nature* **394**(6693): 531-532.
- Morikawa, M. (2006). "Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**(1): 1-8.

Nagaoka, H., Yamanishi, S. y Miya, A. (1998). "Modeling of biofouling by extracellular polymers in a membrane separation activated sludge system." *Water Science and Technology* **38**(4): 497-504.

Nikolaev, Y. A. y Plakunov, V. (2007). "Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms?" *Microbiology* **76**(2): 125-138.

Ölmez, H. y Kretzschmar, U. (2009). "Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact." *LWT-Food Science and Technology* **42**(3): 686-693.

Otto, C., Zahn, S., Rost, F., Zahn, P., Jaros, D. y Rohm, H. (2011). "Physical methods for cleaning and disinfection of surfaces." *Food Engineering Reviews* **3**(3-4): 171-188.

Pan, J. R., Su, Y.-C., Huang, C. y Lee, H.-C. (2010). "Effect of sludge characteristics on membrane fouling in membrane bioreactors." *Journal of Membrane Science* **349**(1): 287-294.

Parish, M., Beuchat, L., Suslow, T., Harris, L., Garrett, E., Farber, J. y Busta, F. (2003). "Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2**(s1): 161-173.

Pavlovsky, L., Sturtevant, R. A., Younger, J. G. y Solomon, M. J. (2015). "Effects of temperature on the morphological, polymeric, and mechanical properties of *Staphylococcus epidermidis* bacterial biofilms." *Langmuir* **31**(6): 2036-2042.

Pavlovsky, L., Younger, J. G. y Solomon, M. J. (2013). "In situ rheology of *Staphylococcus epidermidis* bacterial biofilms." *Soft Matter* **9**(1): 122-131.

Persat, A., Nadell, C. D., Kim, M. K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., y col. (2015). "The mechanical world of bacteria." *Cell* **161**(5): 988-997.

Post, J. C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. y Ehrlich, G. D. (2004). "The role of biofilms in otolaryngologic infections." *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* **12**(3): 185-190.

Querol, A. y Fleet, G. (2006). *Yeasts in food and beverages*. Berlín, Springer, 453 p.

Ramos, B., Miller, F., Brandão, T. R., Teixeira, P. y Silva, C. L. (2013). "Fresh fruits and vegetables—an overview on applied methodologies to improve its quality and safety." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **20**: 1-15.

Rogers, S., Van Der Walle, C. y Waigh, T. (2008). "Microrheology of bacterial biofilms in vitro: *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Langmuir* **24**(23): 13549-13555.

Sanclément, J. A., Webster, P., Thomas, J. y Ramadan, H. H. (2005). "Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis." *The Laryngoscope* **115**(4): 578-582.

Scott, K. (1995). *Handbook of industrial membranes*. Oxford, Reino Unido, Elsevier Science, 904 p.

- Schneider, R. P. y Marshall, K. C. (1994). "Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces—effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2**(4): 387-396.
- Shaw, T., Winston, M., Rupp, C., Klapper, I. y Stoodley, P. (2004). "Commonality of elastic relaxation times in biofilms." *Physical Review Letters* **93**(9): 098102.
- Shirtliff, M. E., Peters, B. M. y Jabra-Rizk, M. A. (2009). "Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria." *FEMS Microbiology letters* **299**(1): 1-8.
- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. y Welsh, M. J. (2002). "A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development." *Nature* **417**(6888): 552-555.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. Michigan, EE.UU., Freeman press, 418 p.
- Stewart, P. S. y Costerton, J. W. (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." *The Lancet* **358**(9276): 135-138.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C., Wilson, S. y Klapper, I. (2002a). "Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29**(6): 361-367.
- Stoodley, P. y Lewandowski, Z. (1994). "Liquid flow in biofilm systems." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(8): 2711-2716.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. y Costerton, J. W. (2002b). "Biofilms as complex differentiated communities." *Annual Reviews in Microbiology* **56**(1): 187-209.
- Swanson, K. M. (1989). *Microbiology and preservation. Processed apple products*. Nueva York, EE.UU., Springer: 343-363.
- Thomas, J. G. y Nakaishi, L. A. (2006). "Managing the complexity of a dynamic biofilm." *The Journal of the American Dental Association* **137**: S10-S15.
- Tierra, G., Pavissich, J. P., Nerenberg, R., Xu, Z. y Alber, M. S. (2015). "Multicomponent model of deformation and detachment of a biofilm under fluid flow." *Journal of The Royal Society Interface* **12**(106): 20150045.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S. y Molin, S. (2000). "Development and dynamics of *Pseudomonas* ssp. biofilms." *Journal of Bacteriology* **182**(22): 6482-6489.
- Tournas, V., Heeres, J. y Burgess, L. (2006). "Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices." *Food Microbiology* **23**(7): 684-688.
- Tournu, H. y Van Dijck, P. (2011). "Candida biofilms and the host: models and new concepts for eradication." *International journal of microbiology* **2012**.
- Towler, B. W., Rupp, C. J., Cunningham, A. B. y Stoodley, P. (2003). "Viscoelastic properties of a mixed culture biofilm from rheometer creep analysis." *Biofouling* **19**(5): 279-285.
- Van Loosdrecht, M. C., Picioreanu, C. y Heijnen, J. J. (1997). "A more unifying hypothesis for biofilm structures." *FEMS Microbiology Ecology* **24**(2): 181-183.

White, G. C. (2010). Handbook of chlorination and alternative disinfectants. Hoboken, EE.UU., Van Nostrand Reinhold, New York (3rd ed., 1992), 1062 p.

Wirtanen, G., Saarela, M. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Biofilms—impact on hygiene in food industries. *Biofilms II: Process Analysis and Applications*. Nueva York, EE.UU., Wiley: 327-372.

Xuetong, F., Bassam, A. y Huang, L. (2009). Improving microbial safety of fresh produce using thermal treatment *Microbial quality and safety of fresh produce*. Iowa, EE.UU., Wiley-Black Well.

Yaron, S. y Römling, U. (2014). "Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence." *Microbial Biotechnology* 7(6): 496-516.

CAPÍTULO 1

AILSAMIENTO, CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y ADHESIÓN DE MICROORGANISMOS

1. INTRODUCCIÓN

El significado de los biofilms en la seguridad alimentaria fue descrito por primera vez en 1994 (Zottola y Sasahara 1994). Han pasado al menos 20 años desde esta primera descripción y hoy se acepta que la mayoría de los microorganismos se encuentran en el medio ambiente formando parte de biofilms (sésiles) y no en forma unicelular o libre (planctónicos), como los estudiados comúnmente en los laboratorios (Donlan 2002). La formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos que les ofrece cuatro ventajas importantes: (i) los protege de la acción de los agentes antimicrobianos, (ii) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (iii) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (iv) posibilita la transferencia de material genético. Todas estas circunstancias pueden incrementar su capacidad de supervivencia.

En la industria alimentaria, la presencia de biofilms en superficies en contacto con los alimentos es la causa principal de contaminación del producto final (Jessen y Lammert 2003; Sofos y Geornaras 2010) debido al proceso de *biofouling*. Históricamente, la preocupación por la estabilidad microbiológica involucraba la prevención del deterioro de los productos intermedios y finales, y el control de microorganismos en los sistemas de procesamiento y distribución (Stratford y col. 2000). En un ambiente de procesado de alimentos, la microbiota existente está formada por una mezcla de muchas especies (Bagge-Ravn y col. 2003; Carpentier y Chassaing 2004; Habimana y col. 2010). En el contexto de las industrias productoras de jugo los microorganismos asociados al deterioro son aquellos que pueden resistir las condiciones ácidas de los mismos. Entre estos se pueden citar a bacterias lácticas (BL) por ejemplo los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*; bacterias de ácido acético incluyendo *Gluconobacter* y *Acetobacter* spp.; levaduras (ejemplo *Candida krusei*, *Zygosaccharomyces* sp., *C. kefir*), mohos y organismos formadores de esporas tales como *Alicyclobacillus* spp. (Samaranayake y col. 1994; Worobo y Splittstoesser 2005; Brugnoli y col. 2007). Dentro de estos grupos de microorganismos las levaduras representan los principales agentes deteriorantes afectando a las industrias asociadas.

Las plantas de procesamiento de frutas pueden variar desde una instalación simple para la extracción de jugo, hasta una compleja instalación que cuente con equipos de UF y OI, almacenamiento en frío y plantas de tratamiento de residuos (Lozano 2006). En las industrias productoras de jugos de fruta, las técnicas de filtración por membrana han

resultado de mucha utilidad para la clarificación de los jugos (Hernández y col. 1990; Cheryan 1998). La UF produce jugos libres de sedimentos y turbidez, ahorrando costos operacionales y materiales, con mayores rendimientos de producción. Es indispensable tener en cuenta que la UF es un proceso donde el líquido es filtrado por diferencias de presión, lo que a lo largo del tiempo puede llevar al compromiso de las propiedades estructurales de los poros debido a la colonización de las membranas. Las líneas de procesado de alimentos pueden verse afectadas en gran medida por el asentamiento de microorganismos. Como ya se ha mencionado, los microorganismos formando parte de biofilms presentan un fenotipo alterado en cuanto a la tasa de crecimiento y de transcripción de genes (Donlan y Costerton 2002) con lo cual representan un serio problema, presentando una mayor resistencia a los procesos de limpieza y desinfección (Bower y col. 1996; Sidhu y col. 2001).

La presencia de estas formas sésiles de microorganismos tiene importancia no solo en lo que respecta a los pulsos de contaminación de los productos, sino que también generan importantes problemas económicos por el impacto negativo que tienen sobre equipos de producción y cañerías disminuyendo la eficiencia de las plantas. Desde un punto de vista más amplio, en lo que respecta a las distintas industrias, su formación y crecimiento causan problemas como corrosión, olores desagradables, taponamiento de tuberías, fallas en equipos y deficiencia en la transmisión de calor (Poulsen 1999).

La eliminación de microorganismos, ya sean patógenos o deteriorantes, de productos como las frutas es difícil debido a la cutina hidrófoba y a abrasiones que suelen presentar en la epidermis que permiten la entrada de microorganismos al interior del alimento (Burnett y Beuchat 2000). Situación que se dificulta más ya que los jugos son producidos con frutas que no siguen los estándares del mercado, también denominadas “frutas de descarte”.

Dados los nutrientes adecuados, el tiempo y la temperatura apropiada, las primeras células que ingresan al sistema y se adhieren pueden finalmente colonizar la superficie de las industrias jugueras (Ridgway y col. 1998; Trachoo 2003) formando grandes agrupaciones de células que culminan en la formación del biofilm. En la Figura 1.1 puede observarse el proceso global de formación de un biofilm, en donde las propiedades fisicoquímicas de la superficie ejercen una fuerte influencia en el grado y extensión de la adhesión (Fletcher y Loeb 1979; Marshall 1991; Smith y col. 1998; Gottenbos y col. 2002; Carré y Mittal 2011). Dentro de las interacciones célula-sustrato que se dan en los primeros eventos de adhesión, se pueden mencionar interacciones de

van der Waals de largo alcance, fuerzas electrostáticas, interacciones ácido-base de Lewis (interacciones polares de corto alcance y fuerzas hidrofóbicas, además de factores externos tales como la gravedad, difusión, precipitación de partículas y dinámica de fluidos (Verwey y col. 1999; Carré y Mittal 2011), sin contar la presencia de la motilidad otorgada por flagelos, fimbrias y pilis en el caso de bacterias. Posteriormente sigue un paso de adhesión irreversible para luego dar lugar a la maduración del mismo.

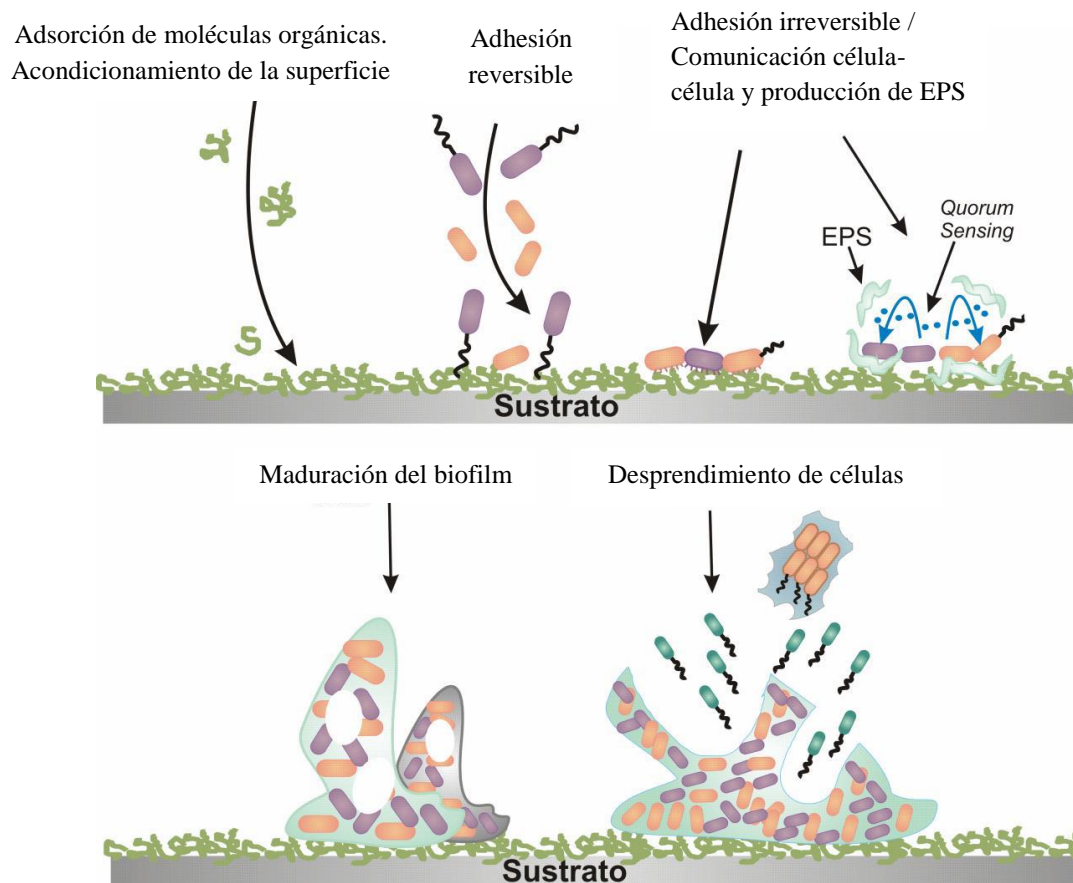


Figura 1.1. Esquema del proceso de formación de un biofilm. Tomado de (Díaz 2011)

Para prevenir el proceso de *biofouling* es indispensable conocer los microorganismos involucrados en la formación de biofilms y es clave la comprensión de los pasos iniciales de su formación en condiciones que reproduzcan el ambiente de las plantas productoras de jugos. La prevención de los mismos se traduciría en la optimización del proceso de clarificación, y en regímenes de limpieza y desinfección menos severos que preservarían la calidad de las membranas.

OBJETIVO GENERAL

Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos a partir de membranas de ultrafiltración obtenidas de industria juguera.

Objetivos específicos

- Aislar, identificar y caracterizar los microorganismos presentes en membranas de ultrafiltración de fluoruro de polivinilideno.
- Estudiar las propiedades fisicoquímicas de los aislamientos realizados en el objetivo anterior.
- Correlacionar las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular de los microorganismos aislados con su cinética de adhesión sobre acero inoxidable en presencia de jugo de manzana de 12 °Brix.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sistema de estudio

En la Figura 2.1 se muestra un diagrama de flujo del proceso productivo de jugo concentrado de manzana y pera. Esta tesis se realizó asociada a una industria productora y exportadora de jugo concentrado de manzana y pera, la cual realiza la clarificación del jugo a través de un sistema de membranas de UF. Los cartuchos de UF (PCI Membrane Systems Inc.) (Figura 2.2) están compuestos por módulos de 19 tubos de fluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés) de 12,5 mm de diámetro y las siguientes características operativas: pH 1,5 - 12, máxima presión aplicable 10 bar, temperaturas máxima 80 °C, 100.000 Daltons de corte molecular, superficie hidrofóbica y alta resistencia a los solventes (PCI-Information). Durante los ciclos de producción las membranas de UF operan a 15 - 20 °C bajo flujo turbulento (velocidad lineal = 2,5 m/s y un flujo de 20 m³/h) y un pH de 3,0 - 4,0 (propio de la materia prima), durante 20 horas. Con una vida útil de aproximadamente 3 años¹ los cartuchos de UF utilizados son reemplazados al no alcanzar los estándares operativos adecuados (ej. caída de flujo de permeado) o debido a su rotura por las elevadas presiones de filtrado aplicadas.

Los ciclos de producción en estas plantas son variables de acuerdo a la época del año según la estacionalidad de la materia prima. En los puntos de máxima producción, coincidentes con la cosecha de la manzana y pera, se llegan a procesar 200.000 toneladas de fruta. La cosecha de pera comienza a principios de enero y finaliza a mediados de marzo, en tanto que la de manzana se extiende desde fines de enero hasta mediados de abril. Fuera de esta época las empresas cuentan con intervalos de producción marcados por la demanda del mercado, con fruta proveniente de cámaras frigoríficas procesándose de 200 a 2.000 toneladas aproximadamente.

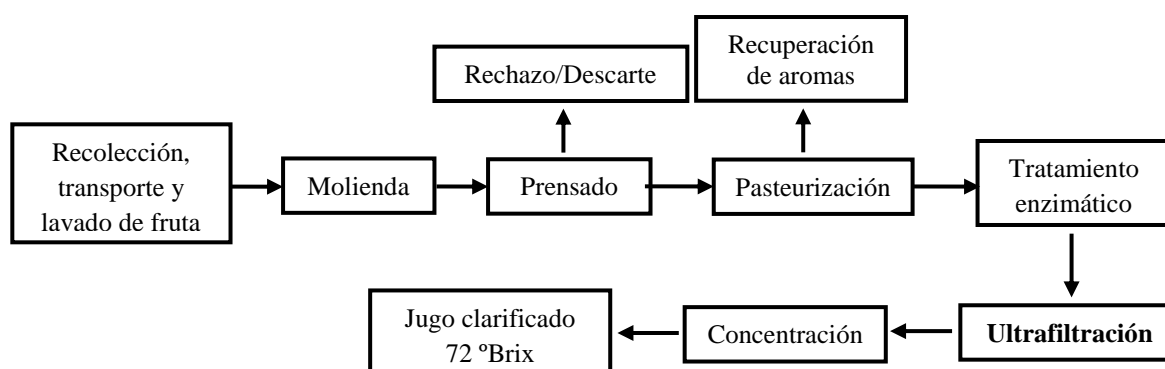


Figura 2.1. Diagrama de flujo del proceso productivo para la elaboración de jugo concentrado de manzana

¹ Información cedida por una empresa productora y exportadora de jugo de manzana y pera.

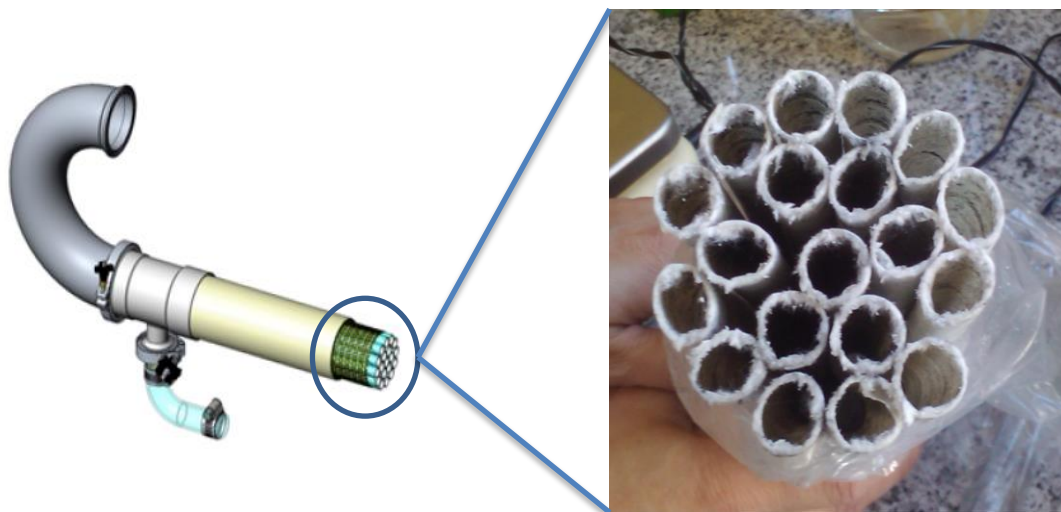


Figura 2.2. Recorte de un módulo tubular de membranas de UF de PVDF usado para clarificación de jugo de manzana.

2.2 Toma de muestras

Las muestras fueron obtenidas de cartuchos de UF cedidos por una empresa productora y exportadora de jugo concentrado de manzana y pera radicada en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina.

Dentro del proceso productivo de la empresa, los cartuchos de UF fueron sometidos a ciclos estándares de limpieza denominados comúnmente *Clean-In-Place* (CIP), en donde a lo largo de periodos que varían entre 8 y 48 horas la empresa realiza ciclos de limpieza y desinfección, debidos por ejemplo a la caída en el flujo de permeado. Una primera instancia consta en la utilización de una solución de hidróxido de sodio (1,5 - 2,0 %) a temperaturas de 50 - 60 °C durante rangos variables de tiempo. Posteriormente, se realiza un paso de desinfección en donde se utilizan soluciones de NaClO a una concentración de 0,2 g/l por 15 minutos, seguido de una etapa final de enjuague. Una vez finalizado este ciclo se evalúa el flujo de permeado, si los valores óptimos no son alcanzados se procede a una etapa de tratamiento enzimático donde lo que se busca es la hidrólisis de hemicelulosas que pudieran estar bloqueando los poros de las membranas. Considerando que las membranas fueron sometidas a repetidos ciclos de producción, limpieza y desinfección, propios de este tipo de empresas se consideró que los microorganismos presentes provenían de comunidades microbianas bien establecidas conformando biofilms. Las muestras de cartucho de UF utilizadas fueron transportadas en bolsas plásticas selladas para retener la humedad hasta su procesamiento.

Además del análisis microbiológico que se detalla en la sección 2.3 “Aislamiento de microorganismos”, las muestras también se acondicionaron como se detalla en el Anexo 1 (“Técnicas microscópicas”) para su observación por microscopia electrónica de barrido (SEM).

2.3 Aislamiento de microorganismos

Se cortaron con tijeras estériles muestras de los tubos de PVDF de 1 cm de largo y 1,25 cm de diámetro. Por duplicado, 10 g de muestras de membrana fueron colocadas en 90 ml de agua peptonada al 0,1 % p/v (Merck) con perlas de vidrio y agitadas por 10 - 15 minutos para desprender los microorganismos adheridos (Lindsay y Von Holy 1997). Las muestras fueron seccionadas de forma tal que la superficie encargada de la filtración estuviera en contacto con las perlas de vidrio. Los resultados fueron expresados como UFC (Unidades Formadoras de Colonias) /g de membrana.

2.3.1 Aislamiento de Bacterias Heterótrofas Totales y Enterobacterias

A partir de las muestras procesadas en el punto 2.2 y sus correspondientes diluciones decimales se procedió al análisis de: (i) Bacterias Heterótrofas Totales (BHT) y de (ii) bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

Para esto en: (i) se reportaron los recuentos de bacterias heterótrofas, mesófilas, aerobias y/o anaerobias facultativas en medio Plate Count Agar (PCA, Britania) incubándose a 25 °C durante 48 - 72 horas. En el caso (ii) las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* se analizaron colocando segmentos de membrana tanto del lado del permeado² como del rechazo³ sobre medio Agar Violeta cristal-Rojo neutro- Bilis- Glucosa (VRBG-agar, Merck), y se incubaron a 35 °C durante 24 horas.

Cada una de las muestras fue analizada por triplicado.

2.3.2 Aislamiento de bacterias ácido-lácticas (BAL)

La toma de muestras se realizó como se detalla en el apartado 2.3 con modificaciones. Las muestras de membranas fueron colocadas en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Britania) con el agregado de 0,01 % v/v de cicloheximida y perlas de vidrio. Las muestras fueron agitadas para desprender los microorganismos adheridos y se las dejó a 25 ± 1 °C durante la noche.

Para el aislamiento, a partir de las muestras enriquecidas, se tomó un mililitro y se realizaron las correspondientes diluciones seriadas en agua peptonada al 0,1 % p/v. Los

² Cara externa de la membrana, en contacto con el jugo filtrado.

³ Cara interna de la membrana, en contacto con el jugo que no fue filtrado.

aislamientos se realizaron en agar MRS por técnica de agotamiento en superficie. Las placas fueron incubadas a 25 ± 1 °C durante 48 horas con tensión reducida de oxígeno. La temperatura de incubación seleccionada fue de 25 °C debido al origen de las muestras. Cada muestra fue analizada por triplicado.

Las colonias aisladas de las placas de agar MRS sospechosas de ser BAL fueron caracterizadas mediante coloración Gram y prueba de la catalasa.

2.3.3 Aislamiento de hongos

En el caso de los hongos (mohos y levaduras) las muestras y sus correspondientes diluciones decimales se utilizaron para realizar los aislamientos en agar Glucosa-Extracto de levadura-Cloranfenicol (YGC por sus siglas en inglés): 2% p/v glucosa (Merck), 0,5 % p/v extracto de levadura (Merck), 0,01 % p/v cloranfenicol (Fluka Chemie) y 1,3 % p/v agar (Merck), pH $6,6 \pm 0,2$. El agar YGC es recomendado como medio estándar ISO para el aislamiento de mohos y levaduras provenientes de muestras de variada actividad acuosa (ISO 1987). Las siembras se realizaron por agotamiento en superficie con un inóculo de 0,2 ml a 25 ± 1 °C durante 5 días. Cada muestra fue analizada por triplicado.

Las diferentes colonias fueron enumeradas e identificadas por sus características macro y micromorfológicas.

Identificación de levaduras

Transcurridos los tiempos de incubación establecidos, sólo se aislaron levaduras las cuales se utilizaron para los subsiguientes análisis y ensayos.

Las muestras fueron sometidas a su identificación definitiva en el Laboratorio de Levaduras del Departamento de Micología del INEI “Dr. Carlos G. Malbrán” (Buenos Aires, Argentina) donde se analizaron tanto sus características fenotípicas (a través de sus caracteres morfológicos), como un perfil bioquímico y fisiológico (fermentación de siete carbohidratos, asimilación de dos fuentes de nitrógeno y diecinueve de carbono, hidrólisis de urea y crecimiento a 37 °C) (Kurtzman y Fell 1998).

Debido a la existencia de perfiles fenotípicos similares en levaduras genéticamente diferentes, se realizó la identificación de cada aislamiento por técnicas moleculares. Para esto se analizaron la secuencia de los dominios D1/D2 de la región del ADN que codifica para la subunidad ribosomal 26S (26S ADNr) y las secuencias de espaciadores internos transcriptos (ITS), utilizados comúnmente para la identificación de levaduras de interés industrial y clínico (Segura y col. 2010; Taverna y col. 2013). Los dominios D1/D2 fueron amplificados por PCR usando los primers NL1 (5'-GCATATCAA-

TAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCTGTTTCAAGACGG-3') (White 1990), mientras que la región ITS fue amplificada a partir de los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGT- GAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las amplificaciones se realizaron con un ciclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc). La extracción de ADN se realizó con el kit comercial UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio) de acuerdo a las indicaciones del proveedor preservándose a -20 °C hasta su utilización, y para la purificación de los productos de PCR se utilizó el kit comercial PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen), según las indicaciones del proveedor. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones (forward y reverse) usando las amplificaciones iniciales y un secuenciador automático de ADN (Genetic Analyzer 3500, Applied Biosystems). Esto se realizó en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán" (Buenos Aires, Argentina). Una vez obtenidas, las secuencias fueron editadas utilizando BioEdit 7.0.0 y la similitud se obtuvo usando la herramienta BLASTN del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.4 Composición del jugo de manzana

El jugo de manzana utilizado en los subsecuentes ensayos fue de tipo clarificado de 12 °Brix preparado a partir de jugo concentrado de 72 °Brix (en caso contrario se aclara la concentración del mismo). Las diluciones se realizaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

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

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

La composición media del jugo de manzana clarificado de 12 °Brix utilizado 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

La composición del jugo de fruta depende tanto de la variedad de la fruta, de su origen, de las condiciones de cultivo, de su procesamiento como del almacenamiento de la misma (Lee y Mattick 1989; Lea 1995). El Alto Valle de Río Negro y Neuquén concentra la mayoría de la producción de jugo del país, procesándose las siguientes variedades: Red Delicious (65%), Gala (15%) y sus clones, y Granny Smith (15%) (Bruzone 2008). Debido a la dinámica de producción de la compañía, los batch de jugos recibidos fueron mezclados antes de su utilización. La empresa busca alcanzar una cierta acidez en el jugo final por lo tanto se produce una mezcla de las variedades para obtener jugos de acidez media.

En cada ensayo el jugo de manzana de 12 °Brix fue previamente esterilizado por microfiltración utilizando membranas de un tamaño de poro de 0,45 µm (Metricel® Grid, GelmanSciences, MI, EE.UU.).

2.5 Caracterización fisicoquímica de la superficie celular de las cepas aisladas

Ensayo de Adhesión Microbiana a Solventes (Microbial Adhesion To Solvents, MATS)

La adhesión es uno de los pasos fundamentales en el desarrollo de un biofilm microbiano, por lo tanto para prevenir o reducir su formación es esencial el conocimiento, entre otros factores, de las propiedades fisicoquímicas de su superficie (Bellon-Fontaine y col. 1996).

La afinidad de las membranas celulares por solventes y la capacidad dadora y aceptora de electrones de la superficie celular de cada una de las cepas se determinaron a través del método indirecto MATS. El método MATS se basa en comparar la afinidad de la superficie celular por solventes polares y no polares, el primero puede ser de naturaleza ácida (aceptor de electrones) o básica (dador de electrones) pero ambos solventes deben tener similar tensión superficial Lifshitz van der Waals.

De acuerdo a lo descrito por Bellon-Fontaine y col. (1996) se utilizaron los siguientes pares de solventes: (i) cloroformo (Dowil, Industria Argentina) como solvente aceptor de electrones y hexadecano (Mallinckrodt Baker, Inc., NJ, EE.UU.) como solvente no polar; y (ii) el par acetato de etilo (Dorwil, Industria Argentina) como dador de electrones y octano (Carlo Erba, Divisione Chimica Industriale, Milano, Italia), solvente no polar.

Los ensayos se realizaron con los cultivos de levaduras previamente aisladas pertenecientes a las especies *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Pichia kluyveri* y *Candida sorboxilosa*.

Cada una de las cepas con las que se trabajó provino de un vial guardado a -70°C en glicerol al 20% (v/v) y caldo YGC. Para los ensayos un vial de cada cepa fue re-suspendido en caldo YGC y cultivado durante 48 horas a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ bajo agitación (50 rpm) en un agitador orbital (Vicking M23, Vicking.s.r.l., Argentina).

Cada cultivo fue centrifugado (Labofuge 200, Kendro, Alemania) a $2000 \times g$ durante 5 minutos, el pellet fue lavado dos veces y re-suspendido en cada una de las siguientes soluciones: NaCl 0,023 mol/l pH 4,0 y NaCl 0,15 mol/l a pH 7,0. La primera solución simula las condiciones de fuerza iónica y pH del jugo de manzana de 12 °Brix, la segunda solución se utilizó con el fin de comparar el efecto del pH y/o la fuerza iónica sobre las propiedades de la superficie celular. El pH fue ajustado adicionando NaOH ó HCL 0,1 M según el caso. Por último se preparó una suspensión ajustada en cada una de las soluciones (NaCl 0,023 mol/l y NaCl 0,15 mol/l) hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0,8 ($\approx 10^7$ células/ml) medida con un espectrofotómetro de luz visible (ThermoSpectronicGenesys 20, ThermoElectronCorporation, MA, USA).

Para el desarrollo del ensayo de adhesión a solventes se mezclaron 4 ml de cada una de las suspensiones celulares ajustadas con 1 ml de cada uno de los solventes en estudio en tubos de vidrio de 15 mm de diámetro y 35 mm de longitud. La mezcla fue sometida durante 2 minutos a agitación vigorosa con un agitador vortex (Genie 2TM, Scientific Industries, Inc., N.Y., EE.UU.) y se dejó reposar hasta la separación completa de las

fases (aproximadamente 10 minutos). Posteriormente se retiró cuidadosamente con jeringas (de manera de no perturbar las fases) 2 ml correspondientes a la fase acuosa y se midió la DO con un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 600 nm.

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 a cada uno de los solventes y reflejando por lo tanto la afinidad de la superficie celular por los mismos. El carácter hidrofóbico se ve reflejado por la afinidad hacia los solventes apolares.

El porcentaje de células adheridas se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% A = 100 \times \left[1 - \frac{DO}{DO_0} \right]$$

Siendo:

% A: afinidad por los solventes

DO: densidad óptica a 600 nm luego del mezclado

DO₀: densidad óptica a 600 nm de las suspensiones previo al mezclado

Cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado

2.6 Ensayos de adhesión sobre acero inoxidable

Se determinó la capacidad de adhesión de las cepas de levaduras aisladas sobre acero inoxidable (AI) como superficie de contacto, y jugo de manzana como matriz líquida. Las cepas fueron cultivadas en caldo YGC durante 48 horas, 25 ± 1 °C y 50 rpm; posteriormente cada cultivo fue centrifugado a $2000 \times g$ durante 5 minutos y el pellet lavado dos veces. El pellet resultante fue re-suspendido en jugo de manzana estéril de 12 °Brix hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0,125 ($\approx 10^6$ células/ml) medida con un espectrofotómetro de luz visible.

Para la adhesión se utilizaron segmentos de acero inoxidable AISI 304 L (rugosidad media: 0,064 μm y calidad alimentaria) de 1 cm x 2 cm. Previo a su utilización las superficies fueron lavadas por 15 minutos con una solución de detergente neutro al 2% (Extran MA 02 neutal, Merck) y enjuagadas 5 veces durante 5 minutos cada vez con agua destilada a 50 °C.

Para la realización de los ensayos de adhesión, los segmentos de AI fueron colocados en cajas de Petri de vidrio (90 cm de diámetro) subdivididas en 6 secciones (Figura 2.3). Las divisiones se hicieron mediante la fusión de la base de la caja de Petri con

segmentos de vidrio, de manera de evitar la superposición de las muestras durante la experiencia (Brugnoni y col. 2007).

Previo a la realización de los ensayos los sistemas compuestos tanto por las cajas de Petri modificadas como por los segmentos de AI fueron autoclavados durante 15 minutos a 121 °C. Para el ensayo de adhesión se analizaron ocho tiempos diferentes: 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos, con lo cual para cada cepa se utilizaron dos cajas de Petri modificadas. Para cada cepa, seis mililitros de suspensión celular ajustada en jugo de manzana fueron colocados por sección (volumen suficiente para que queden completamente sumergidos los segmentos). Las placas fueron incubadas a 25 ± 1 °C a 50 rpm durante los tiempos detallados anteriormente. Al cabo de cada tiempo los segmentos fueron retirados y lavados dos veces con agua destilada estéril a 50 rpm para retirar las células débilmente adheridas y/o no adheridas.

Los ensayos de adhesión se realizaron por duplicado para cada cepa de levadura. En cada tiempo se emplearon segmentos para recuento celular directo por microscopía de epifluorescencia y a su vez se destinaron segmentos para su observación por SEM. Las muestras fueron preparadas como se detalla en el Anexo 1 (“Técnicas microscópicas”).

Los resultados se expresaron como Log del número de células/cm² de superficie, y el porcentaje de superficie cubierta se calculó multiplicando el número de células/cm² en cada tiempo por el área cubierta por una célula, siendo $\text{Área} = \pi \times r^2$ donde r es el radio celular promedio calculado por microscopía electrónica (Staniszewska y col. 2013).

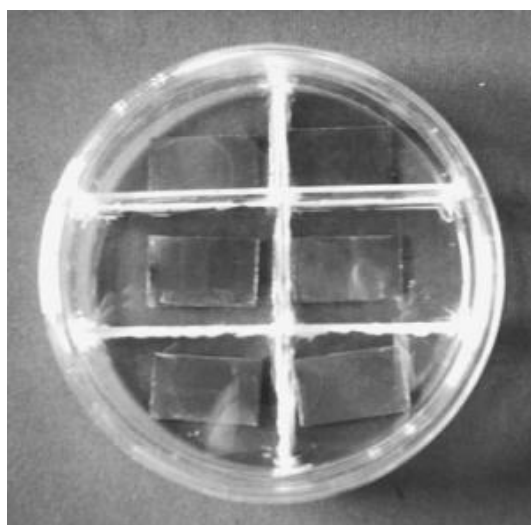


Figura 2.3. Caja de Petri modificada con segmentos de acero inoxidable, sistema utilizado para los ensayos de adhesión.

2.7 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, en los casos posibles las mismas se realizaron a la par para reducir la variabilidad debido a factores extrínsecos. En todos los casos los resultados se expresaron como media \pm desvío estándar (DE).

Se realizó un test t-Student cuando fue apropiado para la comparación de medias y se consideraron como resultados estadísticamente significativos aquellos con un nivel de confianza igual o mayor al 95 % ($p \leq 0,05$).

En el caso de la hidrofobicidad de la superficie celular se realizó una correlación con las tasas de adhesión sobre acero inoxidable a través de un modelo de regresión logarítmica.

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento de microorganismos

La Figura 3.1 muestra la sección de un cartucho de UF con imágenes ampliadas de la cara interna de la misma, obtenidas por SEM, donde se puede observar el proceso de ensuciamiento. En la imagen se aprecian grandes cantidades de material depositados sobre su superficie, deposición que a lo largo del tiempo lleva al recambio de las unidades por bloqueo de los poros y reducción en el rendimiento.

Si bien el proceso de *fouling* debido a material no biológico es de importancia, sólo se mencionarán los estudios realizados sobre la deposición de microorganismos y su consecuente desarrollo (proceso de *biofouling*).

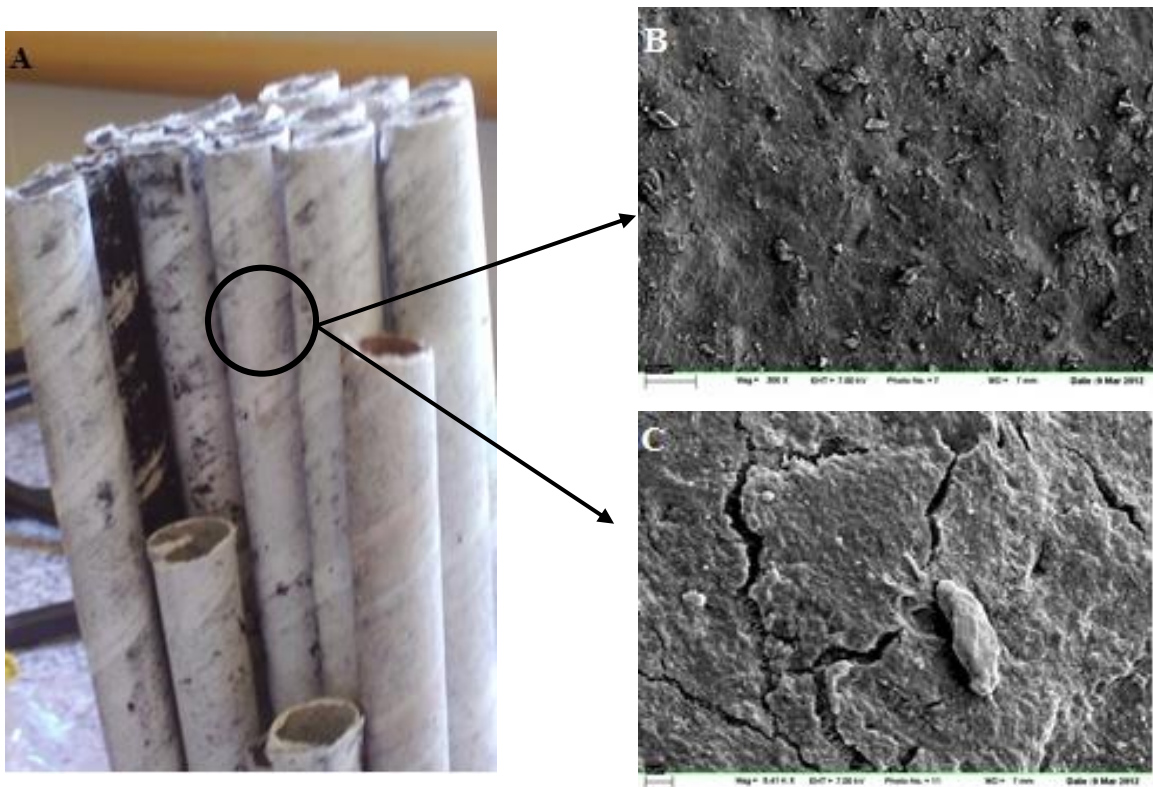


Figura 3.1. A- Muestra de cartucho de UF usado para clarificación de jugo de manzana en donde se ve a lo largo de su superficie la deposición de material. B y C- Vista en SEM de la cara interna. Magnificación 300 x y 5000x, respectivamente.

A partir de las muestras de membrana analizadas se registraron recuentos de levaduras de 7×10^5 a 1×10^6 UFC/g, con 11 aislamientos pertenecientes a 6 especies (entre paréntesis está la nomenclatura utilizada previa identificación por técnicas moleculares, a lo largo de la tesis se utilizará por cuestiones de practicidad): un aislamiento de

Rhodotorula mucilaginosa (L1), tres aislamientos de *Candida krusei* (L2, L9 y L10), dos aislamientos de *Candida tropicalis* (L4 y L5), tres aislamientos de *Candida kefyr* (L3, L7 y L11), un aislamiento de *Candida sorboxilosa* (L8) y un aislamiento de *Pichia kluyvery* (L6); dicha identificación se realizó a partir de sus características micro y macromorfológicas coincidentes con las descritas en Kurtzman y col. (2011). El sólo aislamiento de levaduras a partir de las muestras analizadas revela la gran capacidad de adhesión y alta supervivencia a los procesos de producción y limpieza rutinariamente empleados. Las levaduras representan uno de los principales agentes de deterioro en las plantas productoras de jugo de fruta teniendo la capacidad de crecer a bajo pHs, altas concentraciones de azúcares y condiciones de baja actividad de agua además de resistir, algunas especies, la inactivación por tratamiento térmico (Stratford y col. 2000).

Bajo las condiciones analizadas se registró a su vez el aislamiento de una bacteria Gram +, catalasa negativa, oxidasa negativa, con crecimiento en medio MRS, sospechosa de ser BAL. El bajo número no implica necesariamente que en el sistema de estudio (plantas productoras de jugo concentrado de manzana) este no sea más elevado. Es grupo de microorganismos que forma parte de la comunidad comúnmente hallada en jugos de manzana; sin embargo, su número puede verse reducido en gran medida después de los procesos de pasteurización, concentración y refrigeración (Arias y col. 2002; Suárez-Jacobo y col. 2010).

Considerando que los microorganismos predominantes fueron levaduras, se consideró que las mismas son las responsables de colonizar las superficies comprometiendo profundamente la estabilidad microbiológica de las plantas productoras de alimentos.

3.2 Ensayo de Adhesión Microbiana a Solventes (Microbial Adhesion To Solvents, MATS)

Las Figuras 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7 muestran los porcentajes de afinidad de los 11 aislamientos de levaduras hacia los solventes polares y no polares obtenidos a partir del método MATS.

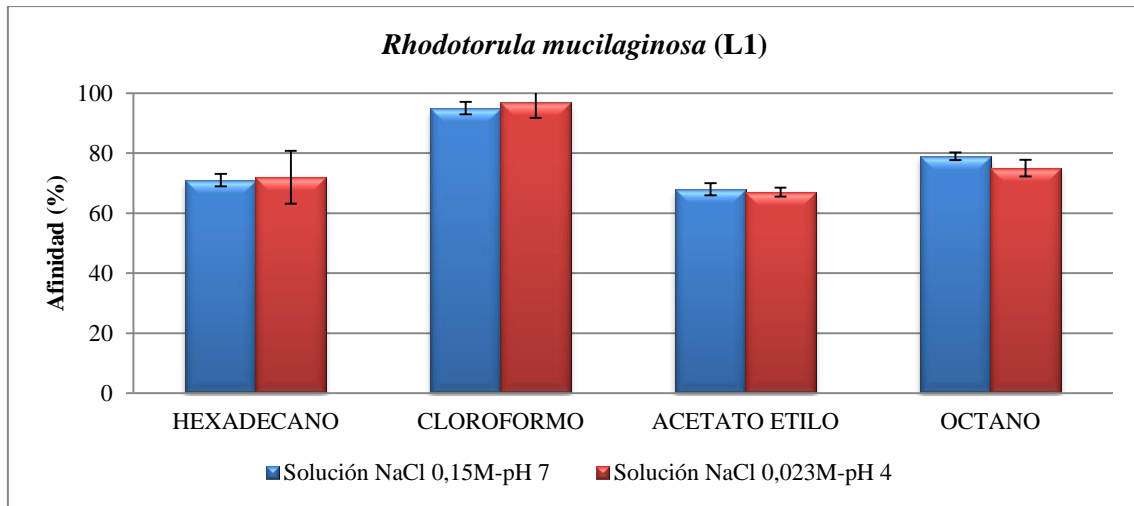
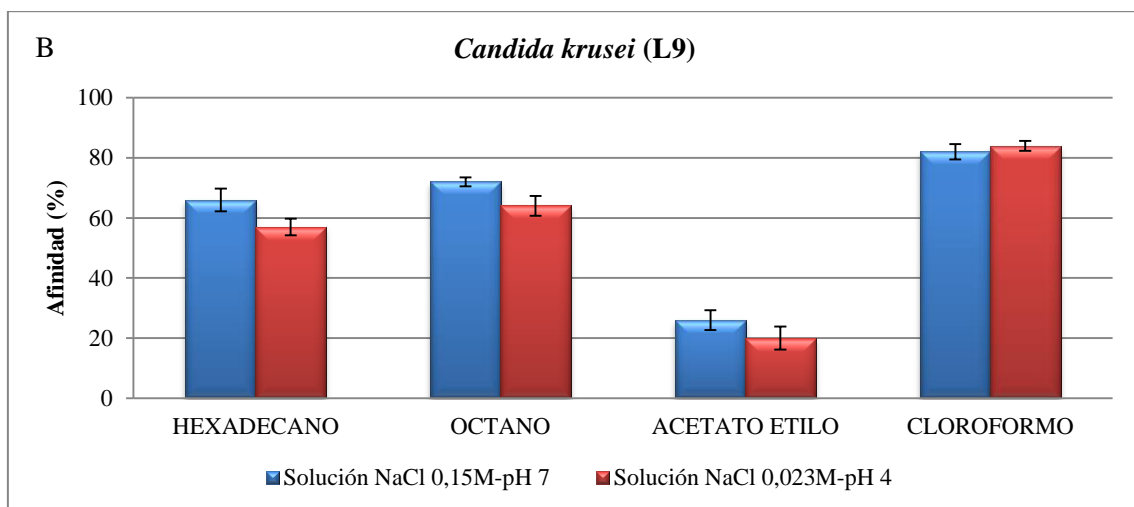
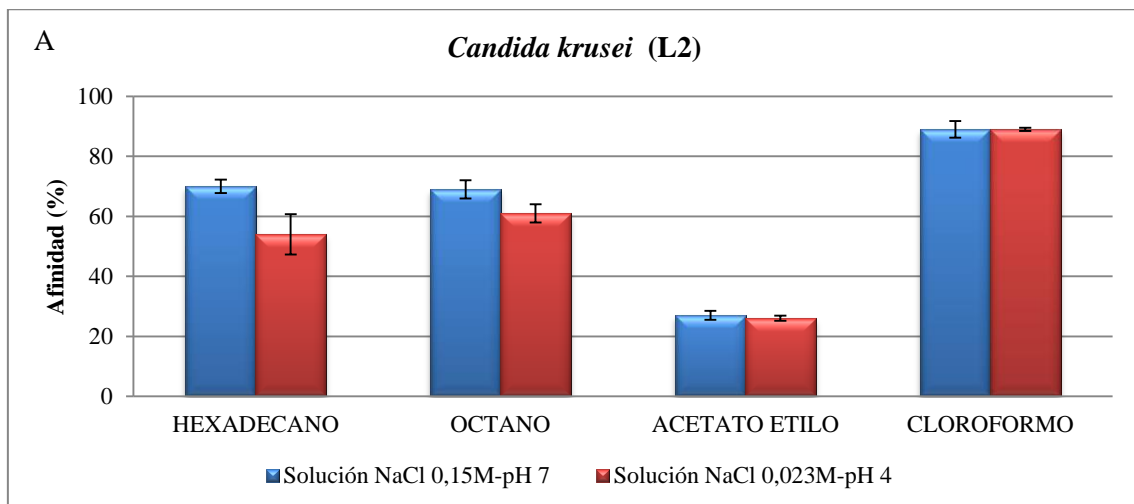


Figura 3.2. Porcentajes de afinidad de *Rhodotorula mucilaginosa* (L1) por hexadecano (H), octano (O), acetato de etilo (AE) y cloroformo (C). Las barras de error representan el desvío estándar de los resultados con respecto a la media.



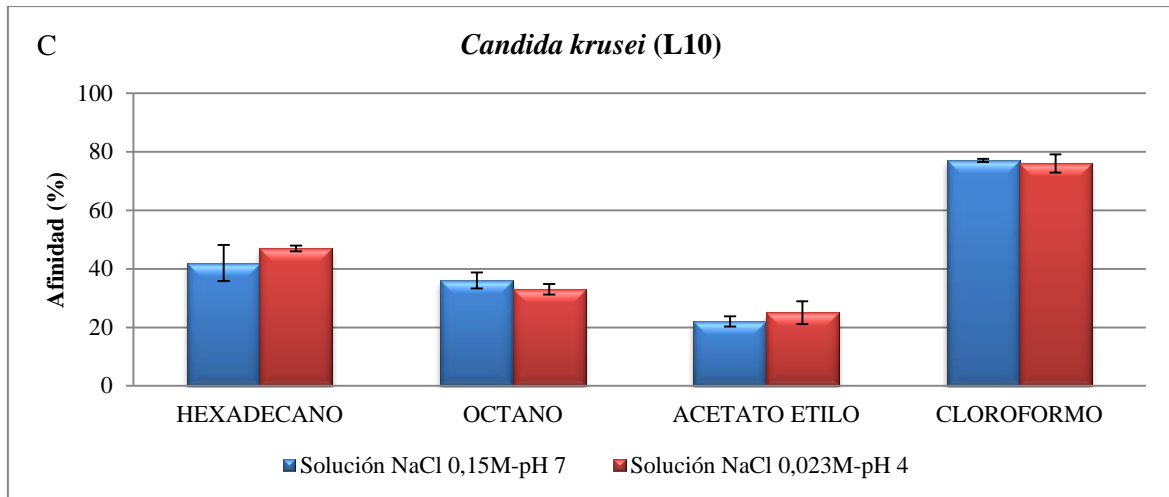


Figura 3.3. Porcentajes de afinidad de: A- *Candida krusei* (L2), B- *Candida krusei* (L9) y C- *Candida krusei* (L10) por los solventes H, O, AE y C. Las barras de error representan el desvío estándar de los resultados con respecto a la media.

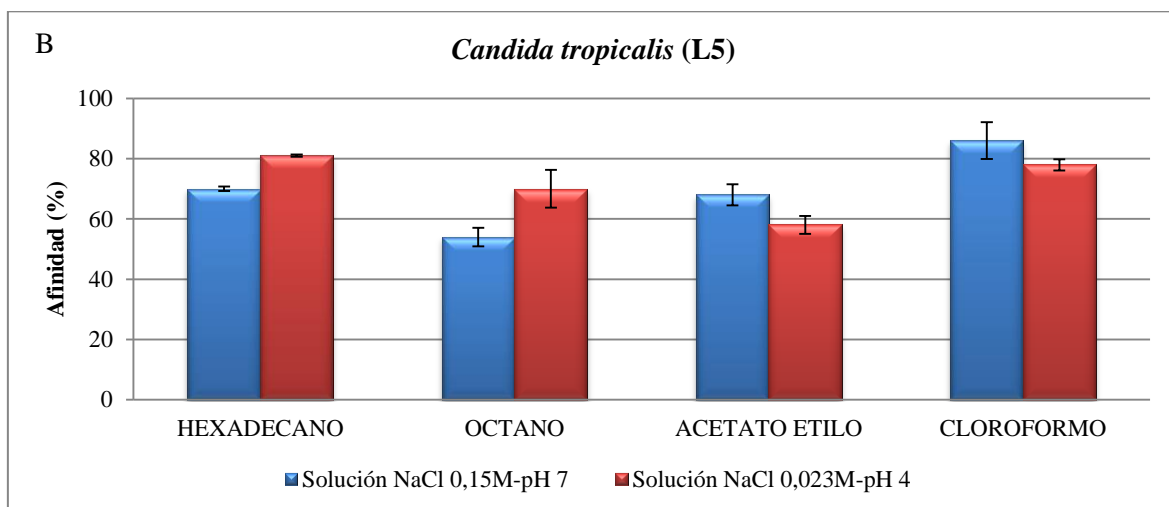
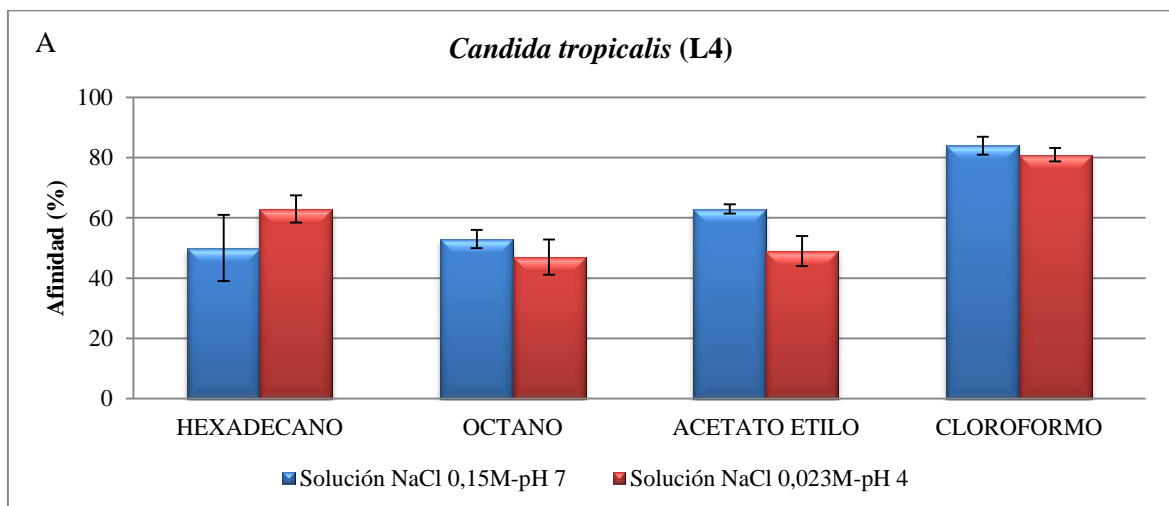


Figura 3.4. Porcentajes de afinidad de: A- *Candida tropicalis* (L4), B- *Candida tropicalis* (L5) por H, O, AE y C. Las barras de error representan el desvío estándar de los resultados con respecto a la media.

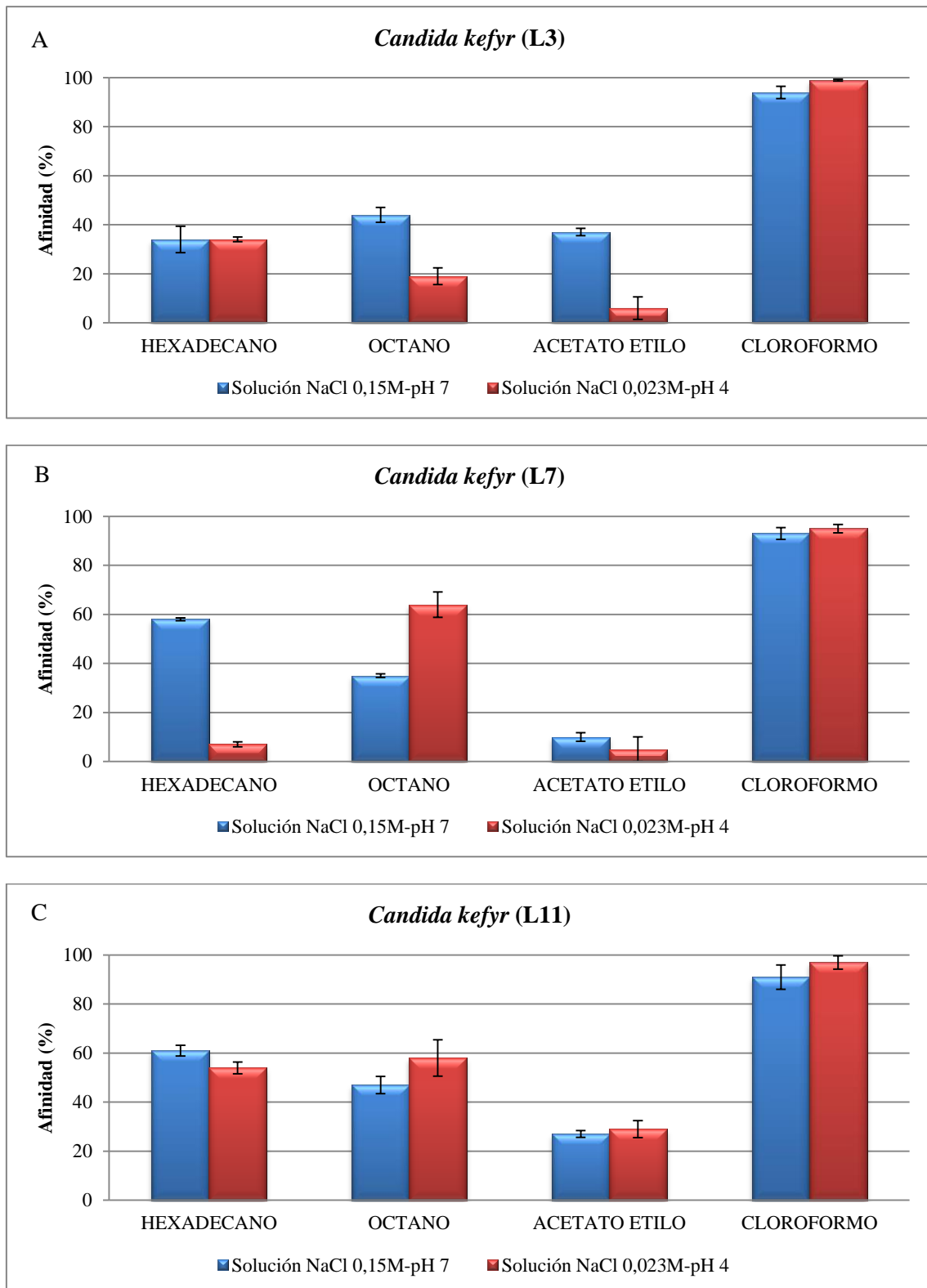


Figura 3.5. Porcentajes de afinidad de: A- *Candida kefyr* (L3), B- *Candida kefyr* (L7) y C- *Candida kefyr* (L11) por los solventes H, O, AE y C. Las barras de error representan el desvío estándar de los resultados con respecto a la media.

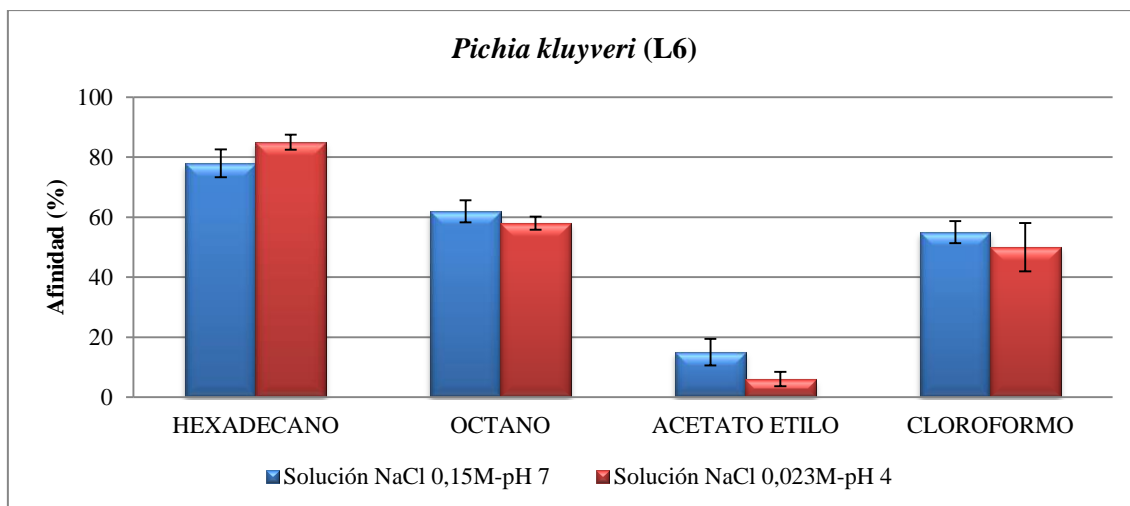


Figura 3.6. Porcentajes de afinidad *Pichia kluyveri* (L6) por los solventes H, O, AE y C. Las barras de error representan el desvío estándar de los resultados con respecto a la media.

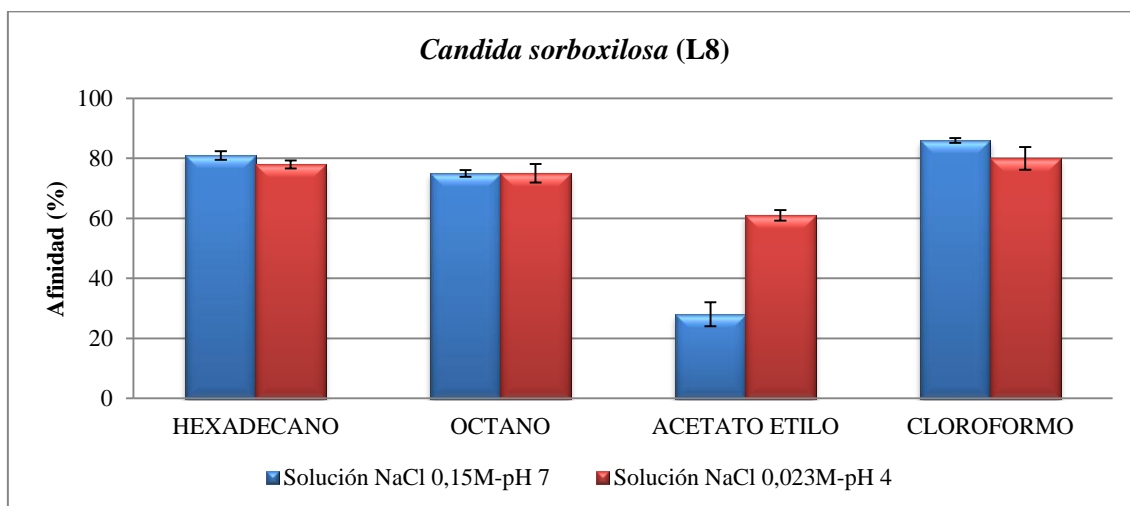


Figura 3.7. Porcentajes de afinidad de *Candida sorboxilosa* (L8) por los solventes H, O, AE y C. Las barras de error representan el desvío estándar de los resultados con respecto a la media.

A partir del análisis de los pares cloroformo/hexadecano y acetato de etilo/octano se evidenciaron diferencias en la afinidad de las membranas celulares por los solventes y la presencia de interacciones dadoras-aceptoras de electrones en la superficie celular; estas diferencias variaron de acuerdo a la cepa en función a las condiciones de pH y fuerza iónica. Esto último demuestra la importancia del análisis de los datos en condiciones que simulen lo más cercanamente posible a las encontradas por los microorganismos en los sistemas reales, en este caso plantas de procesamiento de jugo concentrado. A partir de esto último los análisis subsiguientes se hicieron bajo condiciones de $\text{pH } 4,0 \pm 0,2$ y fuerza iónica $0,023 \text{ mol/l}$, comparables con el jugo de manzana de 12°Brix .

Las mayores afinidades se encontraron para el cloroformo las cuales fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que para el hexadecano con porcentajes que

rondaron entre el 50 - 99 % y el 7 - 85 %, respectivamente. En los casos de L6, L8 y L5 se registraron excepciones donde la afinidad fue mayor para el hexadecano. La comparación entre ambos solventes se realizó por presentar ambos las mismas propiedades de van der Waals (Bellon-Fontaine y col. 1996).

También se determinó el carácter hidrofóbico/hidrofílico siguiendo la clasificación de Li y McLandsborough (1999) De acuerdo a los porcentajes de adhesión de las especies de levaduras al hexadecano (Figuras 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7) las mismas fueron clasificadas como se detalla en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1. Carácter hidrofóbico-hidrofílico de los 11 aislamientos de acuerdo a la clasificación de Li y McLandsborough (1999)

Clasificación	Cepa
Fuertemente hidrofílica: < 10%	L7
Moderadamente hidrofílica: 10-25 %	-
Moderadamente hidrofóbica: 30-55 %	L2, L3, L10, L11
Fuertemente hidrofóbica: > 55 %	L1, L4, L5, L6, L8, L9

El comportamiento con respecto a la presencia de interacciones dadoras-aceptoras de electrones mostró por parte de las especies una mayor tendencia a presentar propiedades básicas (o dadoras de electrones) que ácidas (o aceptoras de electrones). Esto se evidenció por la mayor afinidad por el cloroformo con respecto al acetato de etilo con diferencias entre ambos solventes que rondaron mínimos de 19 % para L8 (cepa que presentó la menor afinidad al solvente), las restantes cepas presentaron valores de afinidad por cloroformo significativamente mayores en comparación al acetato de etilo.

La Figura 3.8 muestra la afinidad de las células por las gotas de hexadecano; en el caso de *Candida kefyri* se muestran dos imágenes ya que dentro de los aislamientos para la misma especie se presenta una variación en la hidrofobicidad.

El aislamiento de *C. kefyri* L7 fue la única cepa altamente hidrofílica mientras que el resto de los 10 aislamientos oscilaron entre moderadamente hidrofóbicos y fuertemente hidrofóbicos.

Las muestras para este ensayo se tomaron de la capa orgánica una vez separada de la capa acuosa mostrándose así la afinidad por el solvente no polar.

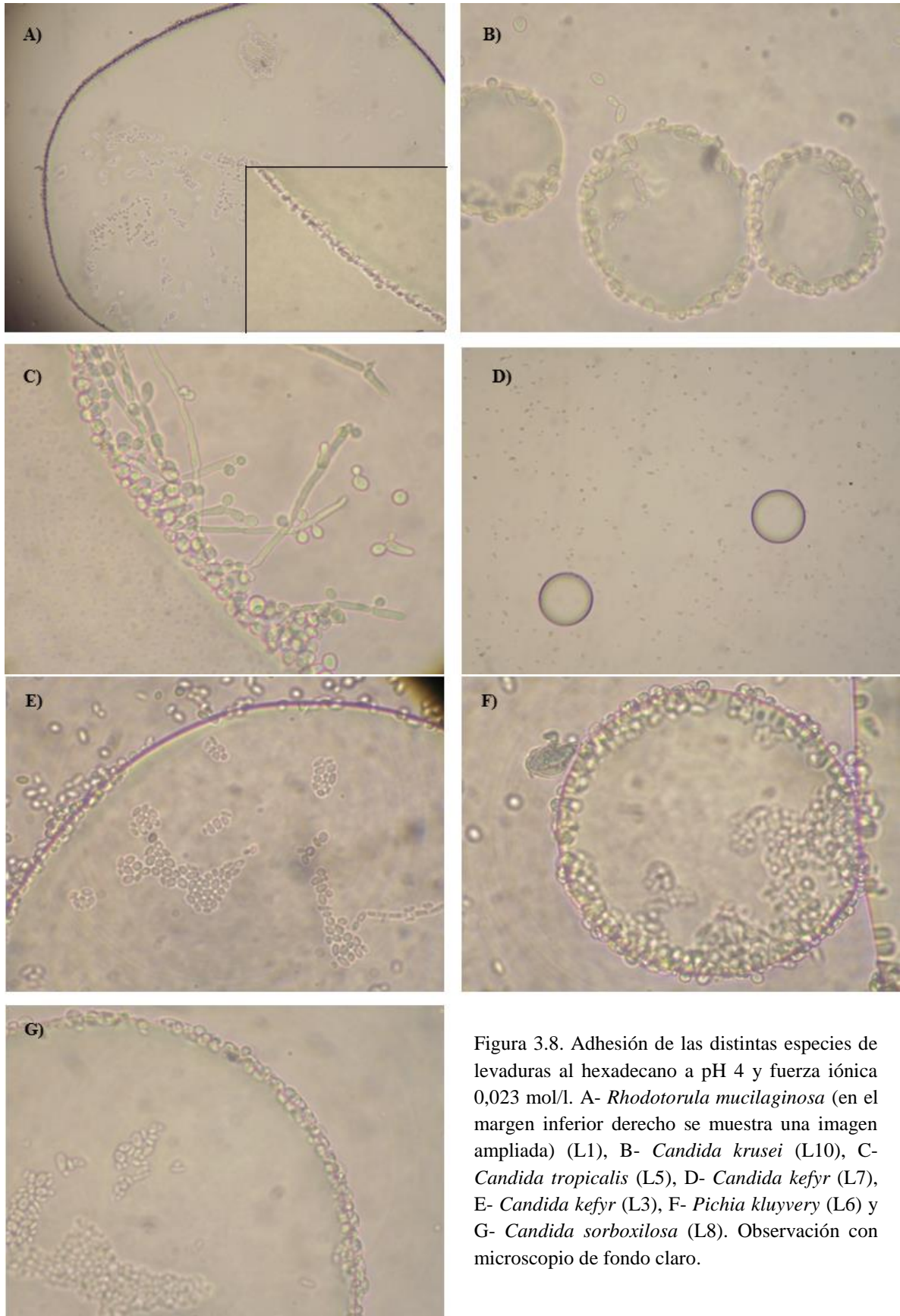


Figura 3.8. Adhesión de las distintas especies de levaduras al hexadecano a pH 4 y fuerza iónica 0,023 mol/l. A- *Rhodotorula mucilaginosa* (en el margen inferior derecho se muestra una imagen ampliada) (L1), B- *Candida krusei* (L10), C- *Candida tropicalis* (L5), D- *Candida kefyr* (L7), E- *Candida kefyr* (L3), F- *Pichia kluyveri* (L6) y G- *Candida sorboxilosa* (L8). Observación con microscopio de fondo claro.

3.3 Adhesión y colonización

Una vez realizados los correspondientes aislamientos con su caracterización se estudió la capacidad de adhesión de las especies de levaduras sobre AI (AISI 304L de calidad alimentaria). En las Figuras 3.9 a 3.14 se muestran los resultados expresados como el logaritmo del número de células adheridas por cm^2 en presencia de jugo de manzana de 12 °Brix como medio líquido (la transformación de los recuentos fue realizada previo cómputo de los promedios y los desvíos estándar).

Teniendo en cuenta que en algunos casos hay más de un aislamiento perteneciente a una misma especie y que en el ensayo anterior (sección 3.2) presentaron diferencias entre las mismas, se analizaron todos por separado.

Como puede observarse en las imágenes obtenidas por SEM (Figuras 3.15) todas las especies analizadas se adhieren a la superficie en estudio difiriendo de acuerdo a la identidad de la especie y al aislamiento dentro de la misma. Esto último es particularmente evidente en el caso de los tres aislamientos de *Candida kefir* donde L7 presenta a tiempos equivalentes adhesiones menores que sus pares L3 y L11, siendo al cabo de los 120 minutos de ensayo de $4,05 \pm 0,47$; $4,86 \pm 0,10$ y $5,50 \pm 0,16$ Log UFC/ cm^2 ($p < 0,05$), respectivamente. En general se presentaron tres grandes grupos en función de sus adhesiones al cabo de 120 minutos, estos estaban conformados por L7 (como ya se mencionó presentó la menor adhesión de todas); L9, L10, L11 con adhesiones en el rango de $4,63 \pm 0,01$ y $4,95 \pm 0,07$ Log UFC/ cm^2 ; y por último el grupo formado por L1, L2, L3, L4 L5, L6, L8 con un rango de $5,30 \pm 0,05$ y $5,57 \pm 0,09$ Log UFC/ cm^2 .

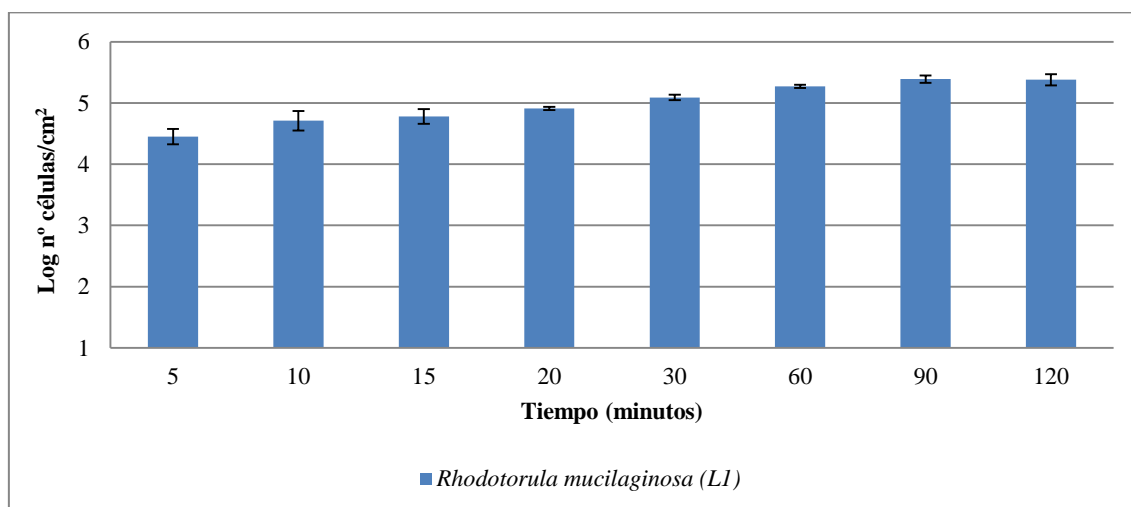


Figura 3.9. Número de células/ cm^2 (Log n° células/ cm^2) de *Rhodotorula mucilaginosa* adheridas a acero inoxidable AISI 304L (media \pm DE) en jugo de manzana 12 °Brix a 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos.

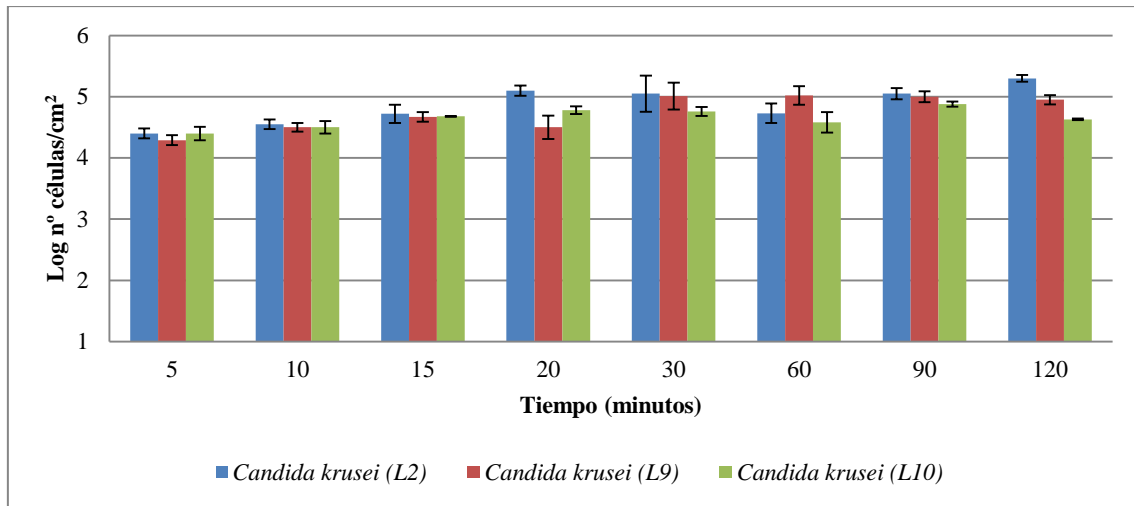


Figura 3.10. Número de células/cm² (Log n° células/cm²) de *Candida krusei* adheridas a acero inoxidable AISI 304L (media ± DE) en jugo de manzana 12 °Brix a 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos.

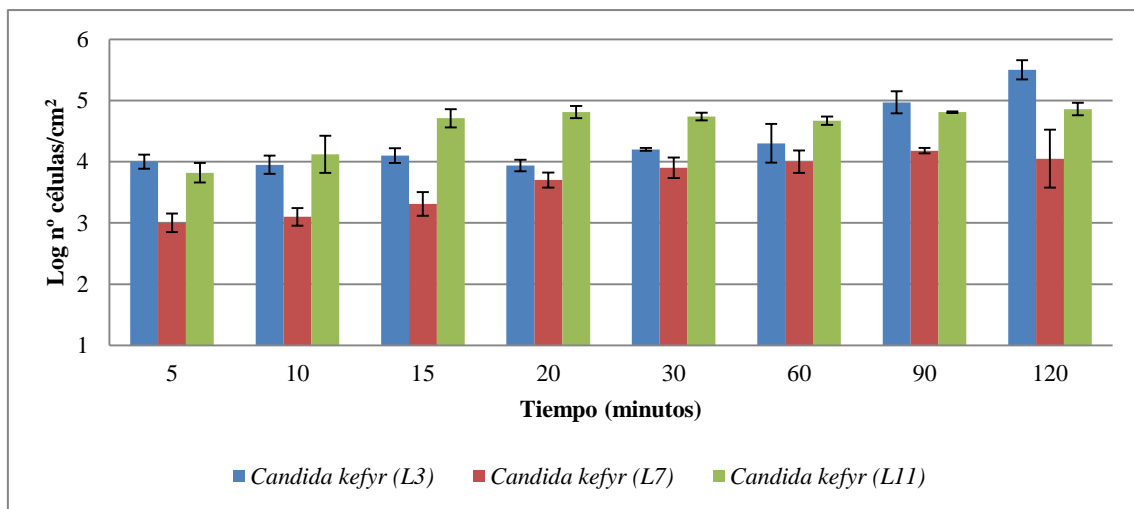


Figura 3.11. Número de células/cm² (Log n° células/cm²) de *Candida kefyr* adheridas a acero inoxidable AISI 304L (media ± DE) en jugo de manzana 12 °Brix a 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos.

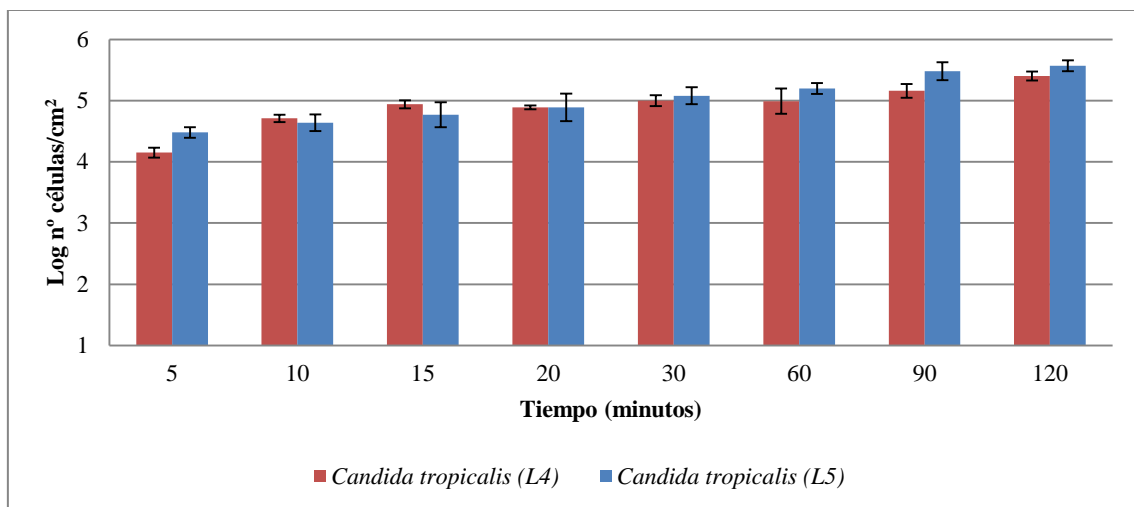


Figura 3.12. Número de células/cm² (Log n° células/cm²) de *Candida tropicalis* adheridas a acero inoxidable AISI 304L (media ± DE) en jugo de manzana 12 °Brix a 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos.

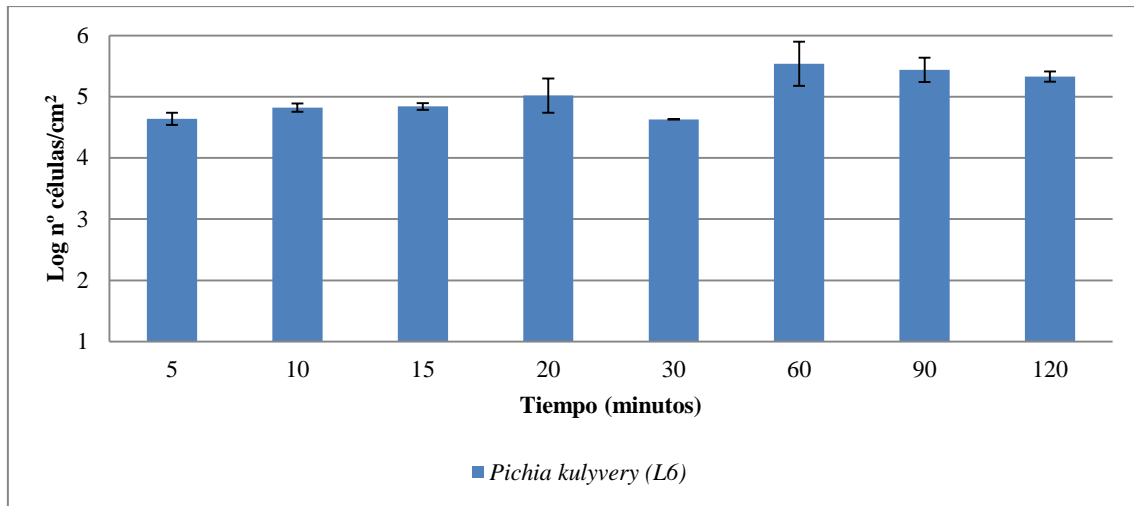


Figura 3.13. Número de células/cm² (Log n° células/cm²) de *Pichia klyvery* adheridas a acero inoxidable AISI 304L (media ± DE) en jugo de manzana 12 °Brix a 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos.

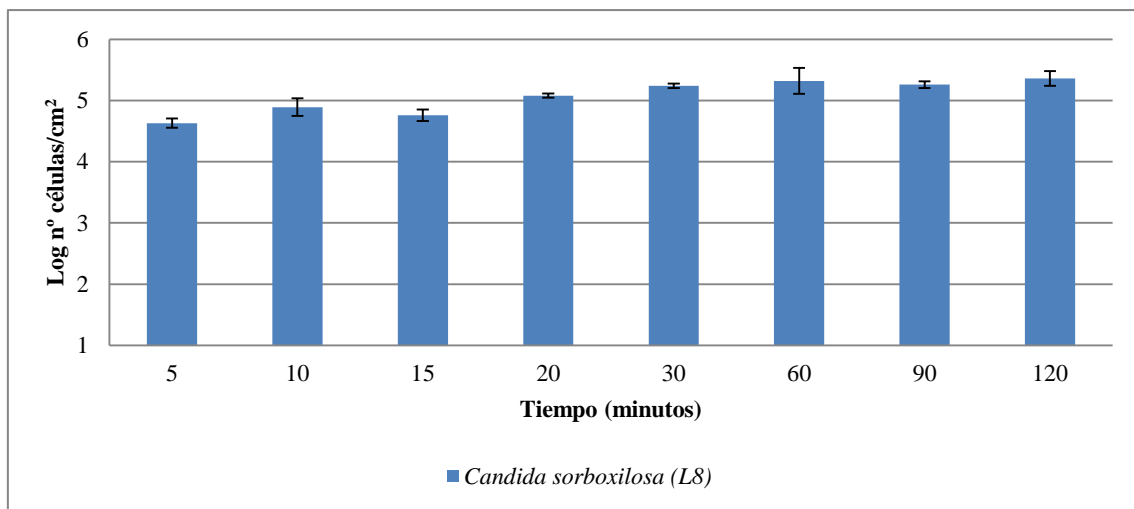


Figura 3.14. Número de células/cm² (Log n° células/cm²) de *Candida sorboxilosa* adheridas a acero inoxidable AISI 304L (media ± DE) en jugo de manzana 12 °Brix a 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos.

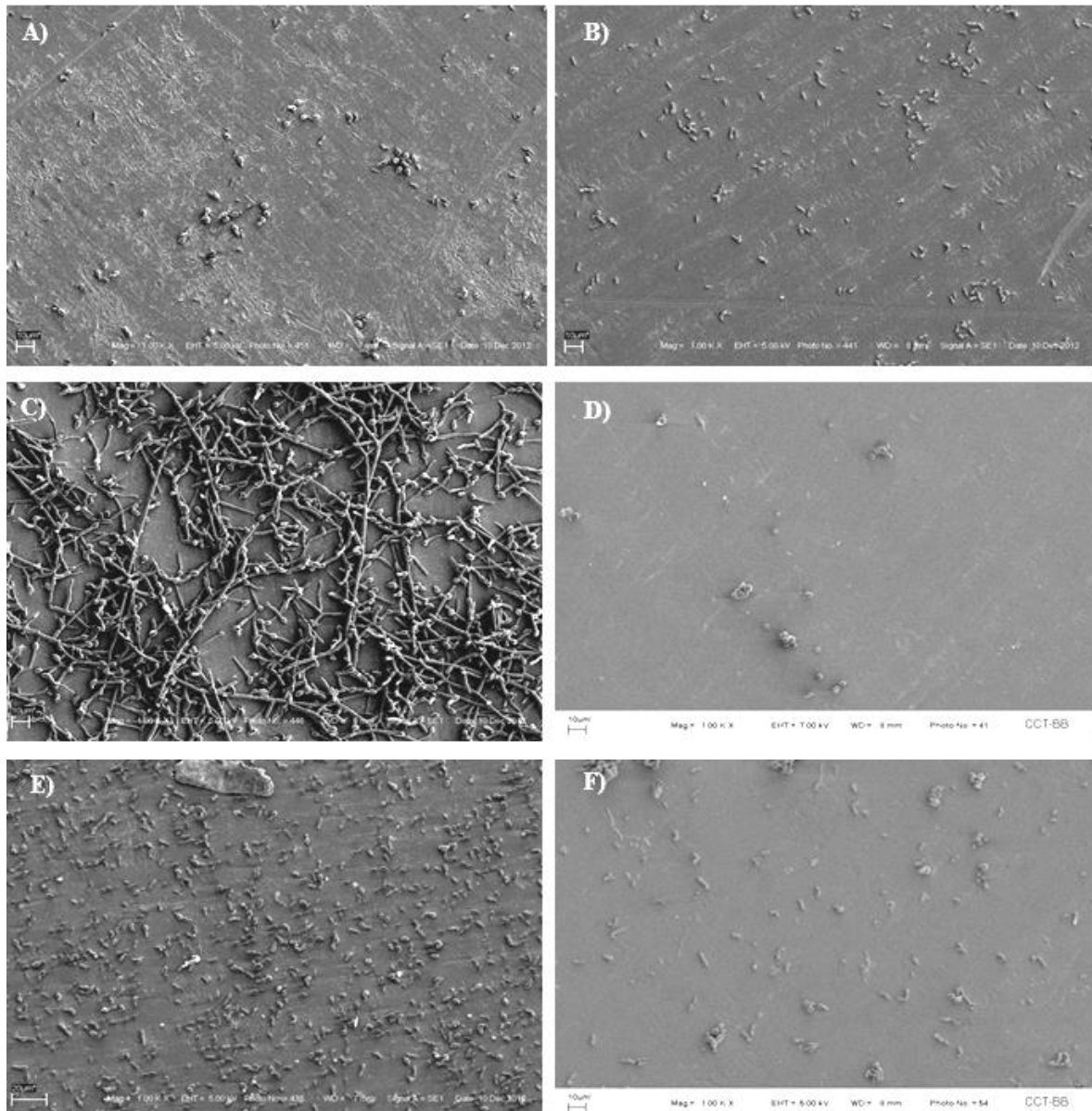


Figura 3.15. Imágenes obtenidas por SEM de 120 minutos de adhesión de: A- L1, B- L3, C- L5, D- L6, E- L8 y F- L9. Las mismas fueron incubadas en jugo de manzana de 12 °Brix y la superficie utilizada fue acero inoxidable AISI 304

Tanto *P. kluyvery* (L6) como *C. sorboxilosa* (L8) presentan adhesiones equivalentes tanto a 5 como a 10 minutos de contacto ($p < 0,05$) las cuales son mayores que las encontradas para *Candida krusei* (L2, L9 y L10) posiblemente debido a la mayor hidrofobicidad por parte de L6 y L8 con respecto a los aislamientos de *Candida krusei*.

En el caso de *Candida tropicalis*, como puede verse en la Figura 3.12, ambos aislamientos presentan adhesiones similares sin diferencias significativas ($p > 0,05$) exceptuando a los 5 minutos de adhesión en donde L4 presenta menores valores que L5 ($p < 0,05$), posiblemente debido a la menor hidrofobicidad de la misma. Con respecto a *Candida kefyr*, los aislamientos presentan una gran diferencia en su capacidad de

adhesión entre ellos, siendo L7 quien presenta adhesiones significativamente menores ($p < 0,05$) que sus pares. Esto puede deberse al fuerte antagonismo entre su característica hidrofílica con la hidrofobicidad de la superficie ensayada (AI), llevando en los primeros 30 minutos de ensayo a las menores adhesiones registradas del total de los aislamientos.

A continuación, para cada caso, se determinó la tasa de adhesión (células/cm² min) por regresión lineal tomando los primeros 30 minutos de ensayo. Las mayores tasas de adhesión se encontraron para L6 y L8 con 4728 y 4309 células/cm²min, respectivamente, seguido del resto con tasas de adhesión en el rango de 385 (L7) y 3913 (L1) células/cm²min. Cabe destacar el siguiente comportamiento de las cepas dentro de una misma especie con respecto a la tasa de adhesión: *Candida tropicalis* > *Candida krusei* > *Candida kefyr*. Analizando la tasa de adhesión de los 11 aislamientos en función de la hidrofobicidad a pH 4 y 0,023 mol/l de fuerza iónica se observó que se correlacionaban positivamente (Figura 3.16). Como se puede ver en la imagen tanto L1, L6 y L8 son las cepas con mayores tasas de adhesión y mayores afinidades hacia el n-hexadecano lo cual concuerda con las características tanto de las membranas de las que fueron aisladas como del AI. En los casos de *Candida kusei* y *Candida tropicalis* no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) en la tasa de adhesión con respecto a las cepas de la misma especie, mientras que *Candida kefyr* presentó diferencias entre las tres cepas, siendo L7 la cepa con menor tasa de adhesión. Este último resultado estaría en concordancia con su carácter hidrofílico (Tabla 3.1) a pH 4.

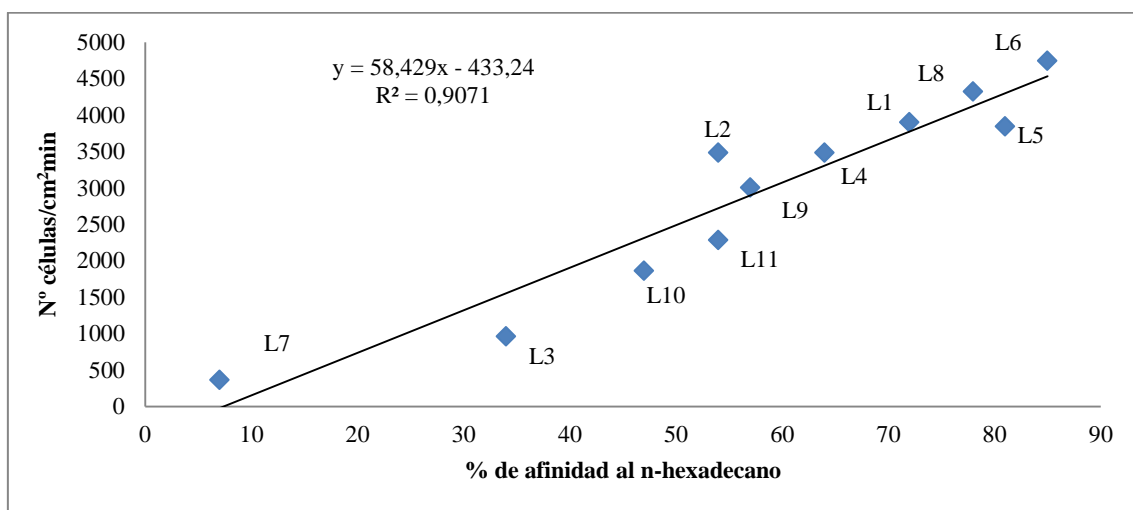


Figura 3.16. Número de células/cm² (Log nº células/cm²) en función del % de afinidad a n-hexadecano de los 11 aislamientos de levaduras determinado por regresión lineal durante los 30 primeros minutos de adhesión.

4. DISCUSIÓN

4.1 Aislamientos de microorganismos

La reducción en el rendimiento de las membranas debido al proceso de *biofouling* es considerado el problema más grave que sufren estos sistemas, y en el que se hace hincapié en esta tesis.

La mayor parte de las frutas son productos de alta acidez, si bien algunas tienen un pH mayor como por ejemplo la banana, el melón, el higo y la papaya. El bajo pH y la naturaleza del ácido orgánico *per se* seleccionan el crecimiento de los microorganismos ácido-tolerantes, tales como mohos y levaduras (Silva y Gibbs 2001; Alzamora y col. 2004), representando una amenaza para las plantas procesadoras de jugo. Si bien estos alimentos pueden ser reservorio de microorganismos patógenos (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) (Food y Administration 2004; Aneja y col. 2014) los hongos en ambientes propicios colonizan más rápidamente las instalaciones dominando los sistemas.

Aunque los jugos de frutas ácidas eran considerados alimentos de bajo riesgo para la salud humana debido precisamente al bajo pH, considerado una barrera lo suficientemente eficaz para controlar el crecimiento de microorganismos deteriorantes y patógenos (Alzamora y col. 2004), es evidente que los microorganismos han desarrollado distintos mecanismos para resistir estos factores de estrés, haciendo precisa la implementación de nuevas tecnologías de conservación. La técnica tradicionalmente utilizada para el control en jugos de manzana ha sido la pasteurización por medios térmicos en flujo continuo la cual puede ser llevada a cabo por intercambiadores de calor en placa o bien intercambiadores de forma tubular. Actualmente, para el tratamiento térmico de jugo de manzana, previo al proceso de UF, se utiliza el método HTST de alta temperatura en tiempos cortos (HTST del inglés: High Temperature/Short Time). En los procesos de pasteurización HTST las temperaturas alcanzadas son de entre 76,6 – 87,7 °C durante 25 a 30 segundos (Moyer y Aitken 1980), inactivando una gran proporción de los microorganismos responsable del deterioro durante el almacenamiento, además de otros microorganismos patógenos (Qin y col. 1995).

Si bien no se encontraron mohos entre los microorganismos aislados, sí se evidenció la presencia dominante de levaduras. Esta dominancia en las membranas de UF se pone de evidencia a partir de los once aislamientos pertenecientes a seis especies diferentes frente a un solo aislamiento de BAL y ninguno de hongos filamentosos. La gran

capacidad que tienen los hongos para sobrevivir, multiplicarse y colonizar rápidamente superficies en condiciones de bajo pH, altas concentraciones de azúcares y baja actividad acuosa, además de resistir la inactivación por tratamiento térmicos (Stratford y col. 2000) pone de manifiesto el peligro que representan para las industrias productoras de jugo concentrado de manzana.

En trabajos previos (Brugnoni y col. 2007; Brugnoni y col. 2011; 2012) se reportaron recuentos de levaduras del orden de 10^7 UFC/ml de levaduras en muestras tomadas de etapas posteriores a la UF en plantas productoras de las mismas características, mostrando una gran capacidad de adhesión y proliferación en AI, material de amplio uso en las industrias. Estos hechos demuestran no solo la predominancia sino también la resiliencia frente a los sucesivos factores de control, y por ende de estrés, aplicados en las distintas etapas de producción.

Se sabe que la estabilidad biológica de las modernas plantas productoras de jugos es muy buena durante el primer año de producción, pero es común observar que comienzan a aparecer problemas de contaminación en los productos durante el segundo año a partir de su instalación. Debido al gran número y diversidad de levaduras encontradas se podría establecer que las levaduras son los microorganismos predominantes en las membranas de UF y la principal causa de *biofouling* de las mismas durante el proceso de clarificación.

En otros casos como el de Tang y col. (2009) se reportó el aislamiento de *Blastoschizomyces capitatus* en membranas de OI en industrias lácteas, mientras que Salo y Wirtanen (2005) en líneas de procesamiento de alimentos de industrias productoras de bebidas citó el aislamiento de *Saccharomyces*, *Candida* y *Rhodotorula* en distintas etapas del proceso de envasado.

La ubicuidad de las levaduras no se circunscribe al ámbito industrial (Brugnoni y col. 2007; Chmielewski y Frank 2007; Harvey y col. 2007; Flemming y Ridgway 2008; Shikongo-Nambabi y col. 2011) sino que también se encuentran colonizando ambientes domésticos, aislándose de utensilios de uso cotidiano como esponjas y repasadores (Rayner y col. 2004) o lavavajillas (Gattlen y col. 2010). En el ámbito hospitalario es conocida su difusión e importancia por ser responsables de infecciones y colonización de catéteres, prótesis, entre otros, con aislamientos pertenecientes a *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* (Samaranayake y Samaranayake 1994; Gilfillan y col. 1998; Noble y col. 2010; Yang y col. 2010; Miceli y col. 2011).

A partir de la búsqueda bibliográfica realizada en distintos buscadores académicos como Scopus y PubMed este es el primer estudio sobre la microbiota de membranas de UF utilizadas para la clarificación de jugos de manzana. El estudio aporta conocimientos no solo en lo que respecta a la identidad de las mismas sino también de sus propiedades fisicoquímicas y adhesiones bajo condiciones relevantes para las industrias.

4.2 Propiedades fisicoquímicas: MATS

El proceso de adhesión microorganismo-superficie es sumamente complejo y está afectado por diversos factores entre ellos: (i) características del microorganismo, (ii) naturaleza de la superficie en estudio, (iii) características del ambiente en el que crecen las células (propiedades fisicoquímicas del medio, la presencia de carbohidratos, proteínas o sustancias bactericidas, etc.) (An y col. 2000; Terada y col. 2006; Carré y Mittal 2011). Es ampliamente aceptado que la colonización de superficies por microorganismos tiene un paso inicial donde las propiedades fisicoquímicas de la superficie, tales como la hidrofobicidad, son uno de los principales factores que median la unión microorganismo-sustrato (Klotz y col. 1985; Fukazawa y Kagaya 1997; Masuoka y Hazen 1997; Votava 2002), en algunos casos esto es reforzado por interacciones adhesina-ligando dependiendo el sistema de estudio. De acuerdo con van Oss (2003), en los sistemas biológicos, la atracción hidrofóbica es la más fuerte de todas las fuerzas no covalentes de unión de largo alcance, no electrostáticas, que se producen entre las partículas inmersas en medio acuoso. Esta fuerza se basa en interacciones en medios polares de tipo aceptor-dador de electrones (teoría ácido-base de Lewis). En medios acuosos, las interacciones ácido-base de Lewis pueden ser atractivas (atracción hidrófoba) o repulsivas (repulsión hidrófila), dependiendo del grado de hidrofobicidad o de hidrofiliidad de la superficie de las entidades involucradas. Se ha registrado que tanto el comportamiento como la adhesión de células de *Candida* spp. a diferentes sustratos se ve afectada por la hidrofobicidad de la superficie celular (Rajkowska y col. 2014), y que la misma varía frente a cambios en la temperatura y fuerza iónica de las soluciones intervinientes (Gallardo-Moreno y col. 2002). Es debido a esto que en esta tesis se plantea su determinación mediante el método MATS y la correspondiente adhesión sobre AI en condiciones reproducibles a las encontradas en las plantas procesadoras de jugo de manzana (pH = 4 y 0,023 mol/l de fuerza iónica).

En las Figuras 3.2 a 3.7 se mostraron los porcentajes de afinidad de cada una de las especies aisladas por solventes polares y no polares. Debido a las propiedades de tensión superficial que presentan los solventes, las diferencias observadas entre los pares cloroformo/hexadecano y acetato de etilo/octano permiten comprobar la presencia de interacciones dadoras-aceptoras de electrones de la superficie celular y también las propiedades de carácter hidrofóbico-hidrofílico. En todos los casos las mayores afinidades se encontraron para el cloroformo (solvente ácido) frente al hexadecano, exceptuando L6 (*Pichia kluyvery*), L8 (*Candida sorboxilosa*) y L5 (*Candida tropicalis*). La presencia de grupos básicos en la superficie celular (Bellon-Fontaine y col. 1996), como por ejemplo, grupos carboxílicos (COO^-), fosfatos (PO_4^{2-}), grupos aminos (NH_2) y sulfitos (HSO_3) (Pelletier y col. 1997; Briandet y col. 1999) podría explicar el carácter dador de electrones que presentaron los aislamientos. En cambio, componentes de las paredes celulares de tipo hidrofóbicos tales como manoproteínas y glicanos podrían explicar la hidrofobicidad, mientras que grupos de carácter hidrofílico se originarían de aminoácidos y fosfatos (Lipke y Ovalle 1998).

En resumen y considerando los datos obtenidos en condiciones experimentales que reproducen tanto el pH como la fuerza iónica del jugo de manzana, las especies de levaduras no solo presentan grupos químicos de carácter básico (grupos hidrofílicos) sino también grupos hidrofóbicos; dándoles la posibilidad de adherirse a superficies que pueden ser de naturaleza hidrófila e hidrófoba.

Tal como lo postula Van der Mei y col. (1995) las cargas de la superficie celular y del sustrato en el cual se adhieren afectan las interacciones hidrofóbicas, favorecidas por bajas repulsiones electroestáticas. Considerando que el AI presenta su punto isoeléctrico a pH entre 3,0 y 4,0 (Boulangé-Petermann y col. 1995), se esperaría la adhesión de cepas con bajas cargas en condiciones comparables a las del jugo, lo cual minimizaría las interacciones repulsivas célula-sustrato.

Tradicionalmente se ha considerado que el potencial de biofouling es mayor para membranas hidrofóbicas que hidrofílicas (Leslie y col. 1993; Knoell y col. 1999; Pasmore y col. 2001) hechos reafirmados por otros estudios (Van Oss 1995; Ghayeni y col. 1998; Knoell y col. 1999; Ong y col. 1999; Pasmore y col. 2001). Estos autores postulan que aumentos en la hidrofobicidad, ya sea de la superficie celular como de las membranas, aumentan la tasa de adhesión a consecuencia de mayores interacciones energéticas célula-membrana. Los resultados arrojados de los ensayos de MATS revelaron que de los once aislamientos, diez resultaron ser moderadamente hidrofóbicos

a fuertemente hidrofóbicos, con lo cual se esperaría que se adhirieran más fácilmente a membranas de la misma naturaleza (interacciones hidrofóbicas/hidrofilicas entre los pares células-sustrato). Si bien esto es cierto no hay que perder de vista que las superficies celulares tienen naturaleza dadora de electrones, resultado también obtenidos por MATS, con lo cual podrían darse posibles interacciones entre los grupos hidrofílicos de las superficies celulares con membranas de la misma naturaleza.

4.3 Adhesiones levaduras-acero inoxidable

La caracterización de la superficie celular y la naturaleza del sustrato han sido utilizadas como valor predictivo de la capacidad de adhesión (Ten Cate y col. 2009). Los estudios al respecto son controvertidos con lo cual el siguiente paso planteado fue estudiar la capacidad de adhesión de las levaduras aisladas de las membranas de UF sobre AI, uno de los materiales más utilizados en las industrias productoras de alimentos. En la adhesión están implicados mecanismos de diferente naturaleza, aquellos que establecen uniones de carácter fisicoquímico donde acercan al microorganismo a la superficie, y otros de naturaleza específica y que implican la presencia de adhesinas y receptores del sustrato tal como lo describió Blanco y col. (2010) en el caso de *Candida albicans*.

Los aislamientos de levaduras realizados (Sección 3.3 “Ensayos de adhesión y colonización sobre acero inoxidable”) mostraron diferencias en sus adhesiones sobre AI, especialmente en el caso de *Candida kefyr*. Estas diferencias intra especie también fueron reportadas por otros autores en el género *Candida* (Panagoda y col. 2001; Henriques y col. 2007; Okawa y col. 2008) y de cepas de *Yarrowia lipolytica* (Amaral y col. 2006). Dichas diferencias en las primeras etapas de adhesión pueden reflejar la presencia de variaciones en la composición de la pared celular de las cepas de levaduras (Mercier-Bonin y col. 2004; Aguedo y col. 2005; Amaral y col. 2006). El estudio de la relación entre las propiedades de la superficie celular, la adhesión y la formación de biofilms ha sido ampliamente estudiado, pero aun así la hidrofobicidad como predictor del proceso de adhesión varía con los grupos de investigación. En los casos de Van Loosdrecht y col. (1987), Gilbert y col. (1991), Peng y col. (2001), Iwabuchi y col. (2003) y Liu y col. (2004) se sugiere que entre ellos hay una fuerte correlación; pero para Sorongon y col. (1991), Parment y col. (1992), Flint y col. (1997) y Parkar y col. (2001) la hidrofobicidad tiene poca a nula relación en la determinación del proceso de adhesión. En nuestro caso, los resultados obtenidos de la determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular de las levaduras aisladas, determinado a pH y

fuerzas iónicas semejantes a las de jugo de manzana, podría ser usado como un índice del proceso inicial de adhesión sobre AI en accesorios de plantas productoras de jugo de manzana.

Analizando la relación hidrofobicidad/adhesión de aislamientos de levaduras, se ha postulado que la hidrofobicidad de *Candida* spp. juega un rol crítico en los primeros eventos que llevan a la adhesión de las células ya sea sobre superficies bióticas como abióticas. Samaranayake y Samaranayake (1994) encontraron que la hidrofobicidad junto con la adhesión están relacionados con infecciones fúngicas en superficies plásticas de uso médico como lo son implantes y catéteres (superficies inertes hidrófobas). Consecuentemente Miyake y col. (1985) reportaron una correlación positiva entre la adhesión de *Candida* spp. a superficies de acrílico, con la hidrofobicidad de las superficies celulares. En tanto Hawser y Douglas (1994) observaron que de todas las especies de *Candida* spp. analizadas, *Candida krusei* desarrolló los biofilms más densos en discos de policloruro de vinilo (PVC) independientemente del medio de cultivo, el cual podría suprimir o promover por otro lado la formación de polisacáridos extracelulares.

Más recientemente Borghi y col. (2011) a partir del análisis de 37 aislamientos clínicos de *Candida tropicalis* encontró una correlación positiva entre la formación de biofilms y la hidrofobicidad, mientras que Brugnoli y col. (2007) estudiando la superficie celular de cuatro aislamientos de levaduras sobre AI, encontró una correlación positiva con la tasa de adhesión. Similares resultados fueron obtenidos en esta tesis al analizar la tasa de adhesión de los once aislamientos en función de la hidrofobicidad, las cuales correlacionaron positivamente (Figura 3.16).

A lo largo de este capítulo se vio que la relación entre las propiedades fisicoquímicas de las células y el proceso de adhesión puede ser controversial, y esto en parte se debe a que la formación de biofilms es un proceso multifactorial que depende tanto de la superficie de estudio y sus características, de los microorganismos involucrados, y del ambiente en el cual se desarrollan.

En el caso de Park y col. (2005) se menciona la topografía de membranas de UF como factor importante. Wong y col. (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 por su

expansión a consecuencia de los aumentos de presión a lo largo del tiempo. En el caso de Carman y col. (2006) utilizando como sistema de estudio zoosporas del alga *Ulva* (sin. *Enteromorpha*) se observa que la bio-adhesión puede verse influenciada por la nano-topografía del material en relación a la formación puntos de adhesión.

Una vez que las levaduras se encuentran cerca de la interfase, interacciones de largo alcance entre las células y la superficie determinan si la célula será atraída o repelida, lográndose un primer paso de adhesión reversible. El cambio desde la adhesión reversible a la irreversible se produce por la transición desde una interacción débil de la célula con el sustrato hasta un enlace permanente, frecuentemente mediado por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares (Rutter y col. 1984; Gristina 1987; Donlan 2001). El siguiente paso es la colonización y maduración del biofilm que da como resultado una arquitectura compleja, con canales y poros. La biomasa y la complejidad del biofilm aumenta a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante (Davies y col. 1998; Anderson y col. 2007). En el caso de biofilms de levaduras estos pasos podrían resumirse de la siguiente manera: (i) una primera etapa de adhesión de las blastosporas (célula levaduriforme) a la superficie (ii) etapa intermedia donde las células de las levaduras comienzan a proliferar cubriendo la superficie mientras producen sustancias poliméricas extracelulares y estructuras celulares más complejas (hifas, pseudohifas, micelios, pseudomicelios), (iii) la maduración y por último (iv) el desprendimiento para la colonización de nuevas superficies. En el caso de *Candida tropicalis*, tal como pudo verse en la Figura 3.15 C, estos pasos son notorios a las dos horas de adhesión, formándose grandes redes de pseudohifas y agregados celulares que cubren la mayor parte de las superficies de AI. Resultados similares fueron encontrados por Silva y col. (2009) quienes inocularon con una cepa de *C. tropicalis*, cultivada en caldo Sabouraud, superficies de poliestireno y observaron este gran desarrollo que ya lo consideraban un biofilm maduro. Hasta el momento y a partir de búsqueda bibliográfica realizada este es el primer reporte de aislamientos de *C. tropicalis* en equipos de procesamiento de alimentos. Un punto a destacar es que a tiempos equivalentes de colonización (2 horas) la mayor cobertura del AI fue alcanzada por *Candida tropicalis*, la cual no es precisamente la que mayor índice de hidrofobicidad presentó, lo que si fue el caso de *Pichia kluyvery*, confirmando que el proceso global de formación de biofilms es un proceso multifactorial.

Teniendo en cuenta que esta tesis se realizó con aislamientos provenientes de membranas que fueron utilizadas para la UF de jugo de manzana, resultan interesantes las implicaciones que tienen para este tipo de industrias. Además, Brugnoli (2008) analizando otras etapas del mismo proceso productivo encontró una alta colonización en distintos puntos por parte del mismo tipo de microorganismos. La presencia de similares poblaciones adherentes no implica necesariamente las mismas cinéticas de colonización en el tiempo, sugiriendo que tanto la adhesión como la conformación del biofilm podría requerir de diferentes adaptaciones moleculares por parte de cada cepa (Chavant y col. 2002). Otros grupos (Bizerra y col. 2008; Silva y col. 2009) reportan diferencias en las capacidades de adhesión y formación de biofilms sobre poliestireno y PVC bajo condiciones de cultivo estáticas. En tanto, varios estudios realizados (Baillie y Douglas 1999; Ramage y col. 2002; Paramonova y col. 2009) establecieron que la presencia de estructuras invasivas como pseudohifas e hifas pueden ser de gran importancia en la integridad estructural de los biofilms maduros; siendo su contenido un parámetro de la resistencia de los mismos (Paramonova y col. 2009). Hecho que se puede deber a que el contenido de quitina de las pseudohifas es al menos tres veces más que el presentado para las blastosporas (Braun y Calderone 1978; Chaffin y col. 1998). La quitina como material hidrofóbico ha demostrado el aumento de la resistencia mecánica y la flexión en sustitutos óseos (Chen y col. 2005), con lo cual podría concluirse 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 los mismos a fuerzas externas. Este último hecho toma relevancia cuando se conoce que las condiciones de flujo que prevalecen en los procesos de UF son de tipo turbulento, con lo cual para adherirse y formar un biofilm, las células tienen que evitar ser desplazadas, resistiendo las fuerzas de arrastre. Se podría asumir por lo tanto que aquellos biofilms con mayor proporción de pseudohifas desarrollándose sobre diferentes tipos de superficies (plástico, acero inoxidable, etc.) van a formar no sólo más rápido los biofilms sino que también con una mayor resistencia ante los procesos de remoción (ej. flujo, procesos de sanitización, etc.). Bajo estas circunstancias es que la gran capacidad de adherirse de *Candida tropicalis*, y el gran desarrollo que presentó en cortos tiempos, sobre acero inoxidable puede proporcionar una ventaja competitiva sobre otras levaduras, planteando un problema higiénico-sanitario además de económico.

5. REFERENCIAS BIBLIORÁFICAS

- Aguedo, M., Wache, Y., Belin, J.-M. y Teixeira, J. A. (2005). "Surface properties of *Yarrowia lipolytica* and their relevance to γ -decalactone formation from methyl ricinoleate." *Biotechnology Letters* **27**(6): 417-422.
- Alzamora, S., Guerrero, S., Nieto, A. y Vidales, S. (2004). Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Manual de capacitación. Roma, Italia, FAO, 72 p.
- Amaral, P., Lehocky, M., Barros-Timmons, A., Rocha-Leão, M., Coelho, M. y Coutinho, J. (2006). "Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682." *Yeast* **23**(12): 867-877.
- An, Y. H., Dickinson, R. B. y Doyle, R. J. (2000). Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. Handbook of Bacterial Adhesion. Nueva York, EE.UU., Humana Press Inc.: 1-27.
- Anderson, B. N., Ding, A. M., Nilsson, L. M., Kusuma, K., Tchesnokova, V., Vogel, V., Sokurenko, E. V. y Thomas, W. E. (2007). "Weak rolling adhesion enhances bacterial surface colonization." *Journal of Bacteriology* **189**(5): 1794-1802.
- Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K. y Aneja, A. (2014). "Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices." *International Journal of Microbiology* **2014**: 1-14.
- Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M. y Parish, M. E. (2002). "Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods." *Applied and environmental microbiology* **68**(4): 1955-1961.
- Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L. y Vogel, B. F. (2003). "Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*." *Journal of Food Protection*® **66**(4): 592-598.
- Baillie, G. S. y Douglas, L. J. (1999). "Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms." *Journal of Medical Microbiology* **48**(7): 671-679.
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. y Van Oss, C. (1996). "Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **7**(1): 47-53.
- Bizerra, F. C., Nakamura, C. V., De Poersch, C., Svidzinski, T. I. E., Quesada, R. M. B., Goldenberg, S., Krieger, M. A. y Yamada-Ogatta, S. F. (2008). "Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance." *FEMS Yeast Research* **8**(3): 442-450.
- Blanco, M. T., Sacristán, B., Lucio, L., Blanco, J., Pérez-Giraldo, C. y Gómez-García, A. C. (2010). "La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia en *Candida albicans*." *Revista Iberoamericana de Micología* **27**(4): 195-199.

Borghi, E., Sciota, R., Biassoni, C., Cirasola, D., Cappelletti, L., Vizzini, L., Boracchi, P. y Morace, G. (2011). "Cell surface hydrophobicity: a predictor of biofilm production in *Candida* isolates?" *Journal of Medical Microbiology* **60**(5): 689-690.

Boulangé-Petermann, L., Doren, A., Baroux, B. y Bellon-Fontaine, M.-N. (1995). "Zeta potential measurements on passive metals." *Journal of Colloid and Interface Science* **171**(1): 179-186.

Bower, C., McGuire, J. y Daeschel, M. (1996). "The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces." *Trends in Food Science & Technology* **7**(5): 152-157.

Braun, P. C. y Calderone, R. (1978). "Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms." *Journal of Bacteriology* **133**(3): 1472-1477.

Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C. y 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.

Brugnoni, L. (2008). Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de frutas. Biología, Bioquímica y Farmacia. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, Universidad Nacional del Sur. **Dr.:** 155.

Brugnoni, L., Lozano, J. y Cubitto, M. (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.

Brugnoni, L. I., Cubitto, M. A. y 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.

Brugnoni, L. I., Cubitto, M. A. y 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.

Burnett, S. y Beuchat, L. (2000). "Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **25**(6): 281-287.

Carman, M. L., Estes, T. G., Feinberg, A. W., Schumacher, J. F., Wilkerson, W., Wilson, L. H., Callow, M. E., Callow, J. A. y Brennan, A. B. (2006). "Engineered antifouling microtopographies—correlating wettability with cell attachment." *Biofouling* **22**(1): 11-21.

Carpentier, B. y 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.

Carré, A. y Mittal, K. L. (2011). Surface and interfacial aspects of cell adhesion. Florida, EE.UU., CRC Press, 532 p.

- Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. y Martínez, J. P. (1998). "Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**(1): 130-180.
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.-N. y 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.
- Chen, B., Sun, K. y Ren, T. (2005). "Mechanical and viscoelastic properties of chitin fiber reinforced poly (ϵ -caprolactone)." *European Polymer Journal* **41**(3): 453-457.
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. Nueva York, EE.UU., CRC press, 552 p.
- Chmielewski, R. A. y Frank, J. F. (2007). "Inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms using chemical sanitizers and heat." *Biofilms in the Food Environment*: 73e104.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. t. y Greenberg, E. (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." *Science* **280**(5361): 295-298.
- Diaz, C. (2011). Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie, Facultad de Ciencias Exactas. **Dr.**
- Donlan, R. M. (2001). "Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process." *Clinical Infectious Diseases* **33**(8): 1387-1392.
- Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." *Emerging Infectious Diseases* **8**(9): 881-890.
- Donlan, R. M. y Costerton, J. W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clinical microbiology reviews* **15**(2): 167-193.
- Flemming, H.-C. y Ridgway, H. (2008). *Biofilm control: conventional and alternative approaches*. Marine and Industrial Biofouling, Springer Berlin Heidelberg: 103-117.
- Fletcher, M. y Loeb, G. (1979). "Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces." *Applied and Environmental Microbiology* **37**(1): 67-72.
- Flint, S., Brooks, J. y Bremer, P. (1997). "The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel." *Journal of Applied Microbiology* **83**(4): 508-517.
- Food, U. y Administration, D. (2004). "Guidance for industry: Juice HACCP hazards and controls guidance first edition; final guidance. Disponible en <https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/juice/ucm072557.htm>."
- Fukazawa, Y. y Kagaya, K. (1997). "Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*." *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **35**(2): 87-99.

- Gallardo-Moreno, A., Méndez-Vilas, A., González-Martín, M., Nuevo, M., Bruque, J., Garduño, E. y Pérez-Giraldo, C. (2002). "Comparative study of the hydrophobicity of *Candida parapsilosis* 294 through macroscopic and microscopic analysis." *Langmuir* **18**(9): 3639-3644.
- Gattlen, J., Amberg, C., Zinn, M. y Mauclaire, L. (2010). "Biofilms isolated from washing machines from three continents and their tolerance to a standard detergent." *Biofouling* **26**(8): 873-882.
- Ghayeni, S. S., Beatson, P., Schneider, R. y Fane, A. (1998). "Adhesion of waste water bacteria to reverse osmosis membranes." *Journal of Membrane Science* **138**(1): 29-42.
- Gilbert, P., Evans, D., Evans, E., Duguid, I. y Brown, M. (1991). "Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*." *Journal of Applied Bacteriology* **71**(1): 72-77.
- Gilfillan, G. D., Sullivan, D. J., Haynes, K., Parkinson, T., Coleman, D. C. y Gow, N. A. (1998). "*Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors." *Microbiology* **144**(4): 829-838.
- Gottenbos, B., Busscher, H., Van Der Mei, H. y Nieuwenhuis, P. (2002). "Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **13**(8): 717-722.
- Gristina, A. G. (1987). "Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration." *Science* **237**(4822): 1588-1595.
- Habimana, O., Heir, E., Langsrud, S., Åsli, A. W. y Møretrø, T. (2010). "Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157: H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(13): 4557-4559.
- Harvey, J., Keenan, K. y Gilmour, A. (2007). "Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains." *Food Microbiology* **24**(4): 380-392.
- Hawser, S. P. y Douglas, L. J. (1994). "Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro." *Infection and Immunity* **62**(3): 915-921.
- Henriques, M., Azeredo, J. y Oliveira, R. (2007). "The involvement of physico-chemical interactions in the adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to epithelial cells." *Mycoses* **50**(5): 391-396.
- Hernández, A., Tejerina, F., Arribas, J., Martínez, L. y Martínez, F. (1990). Microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa. Madrid, España, EDITUM. **4**, 129 p.
- Iwabuchi, N., Sunairi, M., Anzai, H., Morisaki, H. y Nakajima, M. (2003). "Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **30**(1): 51-60.
- Jessen, B. y Lammert, L. (2003). "Biofilm and disinfection in meat processing plants." *International Biodeterioration & Biodegradation* **51**(4): 265-269.

Klotz, S. A., Drutz, D. y Zajic, J. (1985). "Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces." *Infection and Immunity* **50**(1): 97-101.

Knoell, T., Safarik, J., Cormack, T., Riley, R., Lin, S. y Ridgway, H. (1999). "Biofouling potentials of microporous polysulfone membranes containing a sulfonated polyether-ethersulfone/polyethersulfone block copolymer: correlation of membrane surface properties with bacterial attachment." *Journal of Membrane Science* **157**(1): 117-138.

Kurtzman, C. y Fell, J. W. (1998). *The yeast, a taxonomic study*. Nueva York, EE.UU., Elsevier Science, 1076 p.

Kurtzman, C., Fell, J. W. y Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. EE.UU., Elsevier Science, 2354 p.

Lea, A. G. H. (1995). *Apple juice. Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages*. Nueva York, EE.UU., Springer: 153-196.

Lee, C. Y. y Mattick, L. R. (1989). *Composition and nutritive value of apple products. Processed apple products*. Nueva York, EE.UU., Springer: 303-322.

Leslie, G., Schneider, R., Fane, A., Marshall, K. y Fell, C. (1993). "Fouling of a microfiltration membrane by two Gram-negative bacteria." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **73**: 165-178.

Li, J. y McLandsborough, L. (1999). "The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle." *International Journal of Food Microbiology* **53**(2): 185-193.

Lipke, P. N. y Ovalle, R. (1998). "Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges." *Journal of Bacteriology* **180**(15): 3735-3740.

Liu, Y., Yang, S.-F., Li, Y., Xu, H., Qin, L. y Tay, J.-H. (2004). "The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment." *Journal of Biotechnology* **110**(3): 251-256.

Lozano, J. E. (2006). *Fruit manufacturing*. Nueva York, EE.UU., Springer, 230 p.

Marshall, K. (1991). "The importance of studying microbial cell surfaces." *Microbial Cell Surface Analysis*: 3-19.

Masuoka, J. y Hazen, K. C. (1997). "Cell wall protein mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity." *Microbiology* **143**(9): 3015-3021.

Mercier-Bonin, M., Ouazzani, K., Schmitz, P. y Lorthois, S. (2004). "Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system." *Journal of Colloid and Interface Science* **271**(2): 342-350.

Miceli, M. H., Díaz, J. A. y Lee, S. A. (2011). "Emerging opportunistic yeast infections." *The Lancet Infectious Diseases* **11**(2): 142-151.

Miyake, Y., Fujita, Y., Minagi, S. y Suginaka, H. (1985). "Surface hydrophobicity and adherence of *Candida* to acrylic surfaces." *Microbios* **46**(186): 7-14.

- Moyer, J. y Aitken, H. (1980). Apple juice. *Fruit and Vegetable Juice Processing Technology*. Connecticut, EE.UU., AVI Publishing Co.: 212-267.
- Noble, S. M., French, S., Kohn, L. A., Chen, V. y Johnson, A. D. (2010). "Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity." *Nature Genetics* **42**(7): 590-598.
- Okawa, Y., Miyauchi, M. y Kobayashi, H. (2008). "Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31**(8): 1507-1510.
- Ong, Y.-L., Razatos, A., Georgiou, G. y Sharma, M. M. (1999). "Adhesion forces between *E. coli* bacteria and biomaterial surfaces." *Langmuir* **15**(8): 2719-2725.
- Panagoda, G., Ellepola, A. y Samaranyake, L. (2001). "Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity." *Mycoses* **44**(1-2): 29-35.
- Paramonova, E., Krom, B. P., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. y Sharma, P. K. (2009). "Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms." *Microbiology* **155**(6): 1997-2003.
- Park, N., Kwon, B., Kim, I. S. y 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): 43-54.
- Parkar, S., Flint, S., Palmer, J. y Brooks, J. (2001). "Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel." *Journal of Applied Microbiology* **90**(6): 901-908.
- Parment, P., Svanborg-Ede'n, C., Chaknis, M., Sawant, A., Hagberg, L., Wilson, L. y Ahearn, D. (1992). "Hemagglutination (fimbriae) and hydrophobicity in adherence of *Serratia marcescens* to urinary tract epithelium and contact lenses." *Current Microbiology* **25**(2): 113-118.
- Pasmore, M., Todd, P., Smith, S., Baker, D., Silverstein, J., Coons, D. y Bowman, C. N. (2001). "Effects of ultrafiltration membrane surface properties on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm initiation for the purpose of reducing biofouling." *Journal of Membrane Science* **194**(1): 15-32.
- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P. y Bellon-Fontaine, M.-N. (1997). "Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(5): 1725-1731.
- Peng, J.-S., Tsai, W.-C. y Chou, C.-C. (2001). "Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel." *International Journal of Food Microbiology* **65**(1): 105-111.
- Poulsen, L. V. (1999). "Microbial biofilm in food processing." *LWT-Food Science and Technology* **32**(6): 321-326.

Qin, B.-L., Pothakamury, U. R., Vega, H., Martin, O., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, G. y Mermelstein, N. (1995). "Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields." *Food Technology* **49**(12): 55-60.

Rajkowska, K., Kunicka-Styczyńska, A. y Pęczek, M. (2014). "Hydrophobic properties of *Candida* spp. under the influence of selected essential oils." *Acta Biochimica Polonica* **62**(4): 663-668.

Ramage, G., VandeWalle, K., Bachmann, S. P., Wickes, B. L. y López-Ribot, J. L. (2002). "In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**(11): 3634-3636.

Rayner, J., Veeh, R. y Flood, J. (2004). "Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces." *International Journal of Food Microbiology* **95**(1): 29-39.

Ridgway, H., Ishida, K., Rodriguez, G., Safarik, J., Knoell, T. y Bold, R. (1998). "Biofouling of membranes: membrane preparation, characterization, and analysis of bacterial adhesion." *Methods in Enzymology* **310**: 463-494.

Rutter, P., Dazzo, F., Freter, R., Gingell, D., Jones, G., Kjelleberg, S., y col. (1984). Mechanisms of adhesion. Microbial adhesion and aggregation. Berlín, Alemania, Springer: 4-19.

Salo, S. y Wirtanen, G. (2005). "Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains." *Food and Bioprocess Technology* **83**(4): 288-296.

Samaranayake, Y., Wu, P., Samaranayake, L., So, M. y Yuen, K. (1994). "Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces." *Journal of Medical Microbiology* **41**(4): 250-258.

Samaranayake, Y. H. y Samaranayake, L. (1994). "*Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen." *Journal of Medical Microbiology* **41**(5): 295-310.

Segura, G., Luis, E., Kirchmayr, M. R., Flores, B., Ericka, P., Gschaedler, M. y Anne, C. (2010). "PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8 S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas." *e-Gnosis* **8**(2): 1-12.

Shikongo-Nambabi, M. N. N. N., Shoolongela, A. y Schneider, M. (2011). "Control of bacterial contamination during marine fish processing." *Journal of Biology and Life Science* **3**(1).

Sidhu, M. S., Langsrud, S. y Holck, A. (2001). "Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from the food industry." *Microbial Drug Resistance* **7**(1): 73-83.

Silva, F. V. y Gibbs, P. (2001). "*Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes." *Trends in Food Science & Technology* **12**(2): 68-74.

- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D. y Azeredo, J. (2009). "Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition." *Medical Mycology* **47**(7): 681-689.
- Smith, S., Chohan, R., Armstrong, R. A. y Whipps, J. (1998). "Hydrophobicity and surface electrostatic charge of conidia of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*." *Mycological Research* **102**(02): 243-249.
- Sofos, J. N. y 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.
- Sorongon, M. L., Bloodgood, R. A. y Burchard, R. P. (1991). "Hydrophobicity, adhesion, and surface-exposed proteins of gliding bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **57**(11): 3193-3199.
- Staniszewska, M., Bondaryk, M., Swoboda-Kopec, E., Siennicka, K., Sygitowicz, G. y Kurzatkowski, W. (2013). "*Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis." *Brazilian Journal of Microbiology* **44**(3): 813-821.
- Stratford, M., Hofman, P. y Cole, M. (2000). "Fruit juices, fruit drinks, and soft drinks." *The Microbiological Safety and Quality of Food* **1**: 836-869.
- Suárez-Jacobo, Á., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A. y Saldo, J. (2010). "Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice: a preliminary study of microbial shelf-life." *International Journal of Food Microbiology* **136**(3): 261-267.
- Tang, X., Flint, S., Brooks, J. y Bennett, R. (2009). "Factors affecting the attachment of micro-organisms isolated from ultrafiltration and reverse osmosis membranes in dairy processing plants." *Journal of Applied Microbiology* **107**(2): 443-451.
- Taverna, C. G., Bosco-Borgeat, M. E., Murisengo, O. A., Davel, G., Boité, M. C., Cupolillo, E. y Canteros, C. E. (2013). "Comparative analyses of classical phenotypic method and ribosomal RNA gene sequencing for identification of medically relevant *Candida* species." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **108**(2): 178-185.
- Ten Cate, J., Klis, F., Pereira-Cenci, T., Crielaard, W. y De Groot, P. (2009). "Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation." *Journal of Dental Research* **88**(2): 105-115.
- Terada, A., Yuasa, A., Kushimoto, T., Tsuneda, S., Katakai, A. y Tamada, M. (2006). "Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces." *Microbiology* **152**(12): 3575-3583.
- Trachoo, N. (2003). "Biofilms and the food industry." *Biofilms* **25**(6): 808.
- Van der Mei, H., Van de Belt-Gritter, B. y Busscher, H. (1995). "Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 2. Adhesion mechanisms." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **5**(3): 117-126.
- Van Loosdrecht, M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. y Zehnder, A. (1987). "The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion." *Applied and Environmental Microbiology* **53**(8): 1893-1897.

- Van Oss, C. (1995). "Hydrophobicity of biosurfaces—origin, quantitative determination and interaction energies." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **5**(3): 91-110.
- van Oss, C. J. (2003). "Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions." *Journal of Molecular Recognition* **16**(4): 177-190.
- Verwey, E. J. W., Overbeek, J. T. G. y Overbeek, J. T. G. (1999). Theory of the stability of lyophobic colloids. Nueva York, EE.UU., Courier Corporation, 218 p.
- Votava, M. (2002). "Handbook of bacterial adhesion: Principles, methods and applications YH An, RJ Friedman, Eds." *Folia Microbiologica* **47**(5): 583-583.
- Wong, P. C. Y., Kwon, Y.-N. y 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* **340**(1): 117-132.
- Worobo, R. y Splittstoesser, D. (2005). Microbiology of fruit products. Processing fruits. Florida, EE.UU., CRC Press: 261-284.
- Yang, Y., Cheng, M., Wang, C., Wang, A., Cheng, W., Lo, H. y Hospitals, T. (2010). "The distribution of species and susceptibility of amphotericin B and fluconazole of yeast pathogens isolated from sterile sites in Taiwan." *Medical Mycology* **48**(2): 328-334.
- Zottola, E. A. y Sasahara, K. C. (1994). "Microbial biofilms in the food processing industry—Should they be a concern?" *International Journal of Food Microbiology* **23**(2): 125-148.

CAPÍTULO 2

FORMACIÓN DE BIOFILMS

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos de adhesión microbiana y desarrollo de biofilms han sido reportados en medios naturales, clínicos e industriales. Para que estos procesos se den, sólo se requiere la presencia de un entorno hidratado y una mínima cantidad de nutrientes (Kraigsley y col. 2002; Else y col. 2003). Los biofilms constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que permite a los microorganismos sobrevivir en ambientes hostiles, siendo su comportamiento y fisiología significativamente diferentes de aquellos que crecen en forma planctónica. Tomando a los biofilms como estructuras complejas organizadas, su importancia reside en la existencia de un nivel de diferenciación que requiere un sofisticado sistema de señales célula-célula y un determinado grado de especialización celular. El proceso de desarrollo de los mismos es único en biología debido a que involucra la actividad coordinada de varios genomas para generar una comunidad funcional multicelular.

Dentro de las industrias alimentarias el desarrollo de biofilms ha adquirido gran relevancia ya que han sido asociados a industrias cerveceras (Flemming y Ridgway 2008), pesqueras (Shikongo-Nambabi y col. 2011), lácteas (Chmielewski y Frank 2003), de procesamiento de productos cárnicos (Harvey y col. 2007) y jugueras (Brugnoni y col. 2007). Los biofilms pueden formarse sobre todo tipo de superficies (hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas) (Kumar y Anand 1998), incluyendo plástico, vidrio, madera, metal, y sobre los mismos alimentos (Chmielewski y Frank 2003). Su presencia en superficies en contacto con alimentos es considerada un riesgo para la salud porque dentro de su composición pueden contener microorganismos patógenos, aumentando las probabilidades de intoxicaciones e infecciones alimentarias. Se ha reportado que aproximadamente el 80% de todas las enfermedades causadas por microorganismos, incluyendo las transmitidas por alimentos, se deben a su presencia en biofilms (Fux y col. 2005).

La contaminación de alimentos le representa anualmente a las industrias alimentarias pérdidas millonarias (Brooks y Flint 2008) debido al retiro del producto del mercado, la pérdida de la confianza y apoyo del consumidor, además de los costos legales (Fleet y col. 2007; O'Brien y col. 2007).

Tras el descubrimiento del fenómeno de *biofouling* las investigaciones en su mayoría se han basado en el estudio de monocultivos de microorganismos; sin embargo, tales biofilms mono especie rara vez son observados en los ambientes naturales e industriales

(Percival y col. 2000; Sutherland 2001). Una aproximación más realista sería su estudio desde una perspectiva comunitaria (con biofilms mixtos) más que poblacional, en donde se puede encontrar una estrecha relación entre diferentes microorganismos (Figura 1.1). En estas comunidades los microorganismos se comportan como consorcios en donde las relaciones son variadas habiéndose reportado en la bibliografía tanto relaciones de inhibición entre sus integrantes (Guillier y col. 2008) como de sinergismos, con aumento, en muchos casos, de la supervivencia (Cowan y col. 2000; Ica y col. 2012) de los distintos integrantes patógenos o no patógenos (Lebert y col. 2007; Chorianopoulos y col. 2008; Kay y col. 2011; Kostaki y col. 2012). Una vez incluidos en estas comunidades los microorganismos interactúan intra e inter específicamente, moldeando la estructura y composición del biofilm.

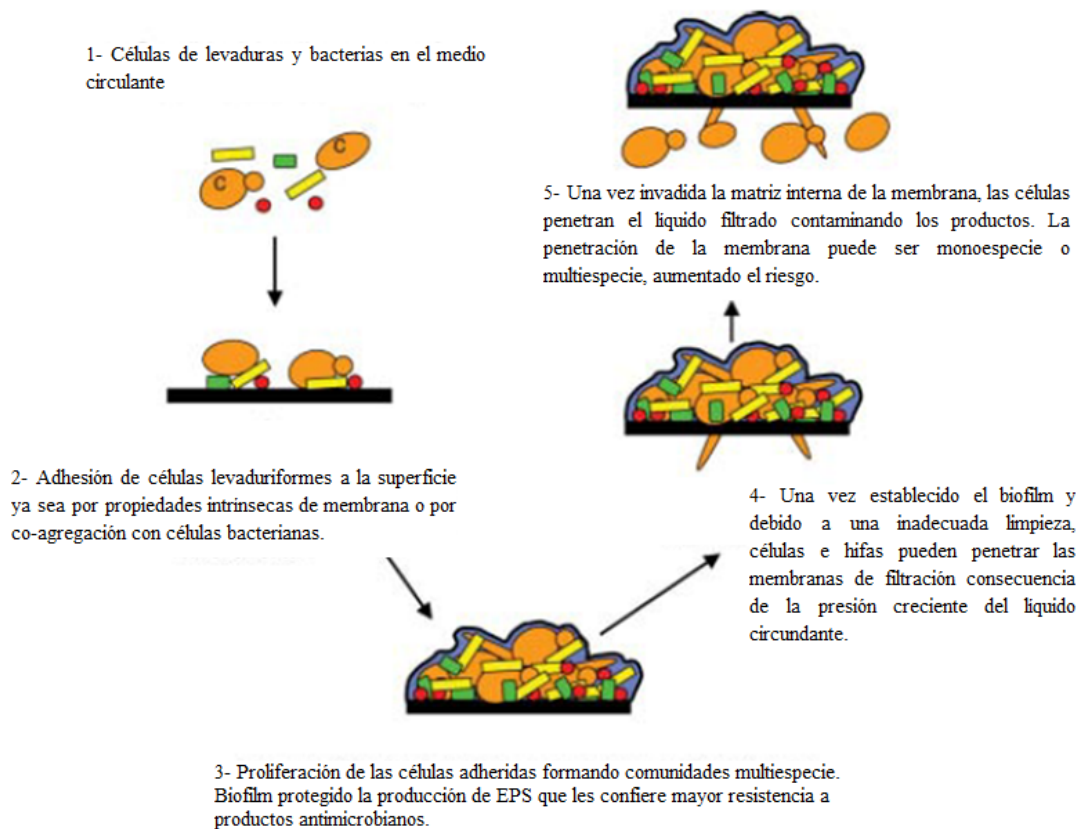


Figura 1.1. Modelo esquemático de la formación de biofilms multi-especies. Modificado de Ten Cate y col. (2009)

Otra de las características de los biofilms es la intercomunicación entre sus integrantes. Para que una comunidad pueda tener éxito sus miembros deben poder comunicarse, lo mismo sucede a lo largo de los biofilms con los microorganismos. Dentro del entorno

de un biofilm, las especies son dinámicas y utilizan una amplia gama de señales célula-célula como por ejemplo el proceso denominado *quorum sensing*. Este fenómeno promueve el comportamiento colectivo dentro de una comunidad mejorando el acceso a los nutrientes y microambientes, así como proporcionando una defensa colectiva contra otros competidores (Hogan 2006; Nikolaev y Plakunov 2007; Williams 2007).

Desde el reconocimiento de los biofilms multi especie, la mayor parte de los estudios abarcan los biofilms bacterianos, mientras que aquellos orientados a su formación por parte de levaduras son muy pocos o escasos y están relacionados al ámbito médico (El-Azizi y col. 2004) siendo *Candida albicans* la especie más estudiada por lejos. A pesar de este hecho las levaduras figuran como los principales deteriorantes de alimentos de naturaleza ácida.

Como ya se ha mencionado, las levaduras son microorganismos con capacidad de crecer a bajos pHs, altas concentraciones de azúcares y condiciones de baja actividad de agua (Stratford y col. 2000; Brugnoli y col. 2007). Salo y Wirtanen (2005) en líneas de procesamiento de alimentos aislaron levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Rhodotorula* a partir de biofilms en cintas transportadoras y envasadoras de industrias productoras de bebidas. Por otro lado se ha establecido que las levaduras son capaces de adherirse y desarrollar biofilms en las membranas de UF utilizadas en la clarificación de bebidas (como se desprende del Capítulo 1) y en los equipos de procesamiento pre y post UF (Brugnoli y col. 2007). Los sistemas de filtración por membranas no son de fácil acceso en los procedimientos de limpieza y desinfección, con lo cual generalmente no pueden ser completamente removidas del sistema (Brugnoli y col. 2012a); sumado a esto, aquellas que se encuentran adheridas son altamente resistentes a los agentes biocidas (Brugnoli y col. 2012b) con lo cual aún números inicialmente bajos de células sobrevivientes pueden formar biofilms.

En muchos casos los biofilms iniciados por microorganismos con alta capacidad de colonización pueden favorecer la inclusión de otros aunque éstos se encuentren en bajo número. Los microorganismos patógenos pueden ser capaces de adherirse a superficies industriales y formar biofilms, pero no siempre pueden persistir por largos períodos. Se ha observado la asociación de varias especies patógenas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori* en la formación de biofilms multi especie. Aunque todas ellas son capaces de adherirse a una superficie y comenzar el crecimiento, la mayoría no tienen capacidad por sí solas de

completar el desarrollo del biofilm y la razón de su éxito se debe en parte a la asociación e interacción con microorganismos pre-existentes en las superficies (Giaouris y col. 2015). Un ejemplo de lo anterior es la asociación entre bacterias y levaduras. Esta interacción se encuentra naturalmente en el ambiente de producción de muchas industrias alimentarias. Sin embargo, las interacciones e interrelaciones entre bacterias y levaduras en biofilms y su contribución a la dispersión de patógenos han sido poco estudiadas (Jahid y Ha 2014). Se puede especular que la microbiota residente, formando parte de los biofilms, puede aumentar la contaminación cruzada por parte de bacterias patógenas mediante su protección en los biofilms mixtos, otorgándoles protección, nutrientes, anclaje (Pérez-Rodríguez y col. 2008).

Si bien las bacterias y hongos se encuentran juntos en una gran variedad de ambientes interactuando a través de diversos mecanismos (Shirliff y col. 2009) se sabe relativamente poco sobre el comportamiento de estas comunidades (Nair y Samaranyake 1996a; Thein y col. 2006; Peters y col. 2010). La mayor parte de los trabajos publicados de interacciones inter específicas entre levaduras y bacterias están centrados en aquellas interacciones hongo-bacteria de relevancia clínica, especialmente de la especie *Candida albicans* y bacterias asociadas a infecciones en salud humana, siendo escasos los estudios a partir de especies aisladas de establecimientos asociados a la industria alimentaria. Un punto interesante a delinear en lo que respecta a biofilms mixtos levadura/bacteria es que ambos grupos de microorganismos tienen diferentes dimensiones, con lo cual por ejemplo, en los sistemas de separación de membrana donde la superficie a adherirse presenta una porosidad y rugosidad dada, ambos pueden acomodarse adaptándose a las distintas irregularidades (Whitehead y col. 2005).

En el caso de alimentos como jugos de manzana y otros de frutas cítricas, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA y col. 2001) reportó a *E. coli* O157:H7, *S. enterica* y *Listeria monocytogenes* como patógenos de interés para la inocuidad de los mismos (Cheng y col. 2003; Gabriel 2013), con lo cual la peligrosidad de su presencia cobra mayor importancia.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la dinámica de adhesión y formación de biofilms mono y multi especie sobre superficies utilizadas en la industria alimentaria.

Objetivos específicos

- Estudiar la dinámica de adhesión de biofilms multiespecie de *Candida tropicalis* y *Candida krusei* con *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp., sobre superficies de acero inoxidable.
- Estudiar las variaciones en la composición celular y la arquitectura de las poblaciones/comunidades resultantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las secciones que se detallarán a continuación tienen como objetivo evaluar la formación de biofilms duales entre levaduras y bacterias. Para esto, primero debe establecerse que las bacterias patógenas que se utilizarán sean capaces de sobrevivir en el medio ácido representado por el jugo de manzana. Suponiendo una respuesta positiva, se evaluará si dicha exposición mejora su supervivencia. En un bloque posterior se evaluará a través de ensayos de co-agregación las posibles interacciones bacteria-levadura, que finalmente serán ensayadas a partir de dos casuísticas diferentes basadas en las frecuencias poblacionales microbianas presentes en la industria procesadora de jugos de fruta: a) incorporación de patógenos a biofilms pre-formados de levaduras, y b) adhesión simultánea sobre la superficie de levaduras y patógenos. El caso potencial de que las levaduras encontraran un biofilm ya establecido de bacterias patógenas no se analizará debido a que es el menos probable, por las bajas concentraciones en las que se encuentran y a que generalmente bajo las condiciones de estudio son pobres formadoras de biofilms.

2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Dentro de las levaduras ensayadas se utilizaron las cepas L5 y L9 correspondientes a *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, respectivamente (Capítulo 1), mientras que las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933) y *Salmonella* sp. (aislada de hamburguesa de pollo en el Laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos de la Universidad Nacional del Sur).

En el caso de las cepas de levaduras se utilizaron viales conservados a -70°C los cuales fueron re-suspendidos en caldo YGC durante 48 horas a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ bajo agitación (50 rpm). Las células de cada cultivo fueron separadas por centrifugación (Labofuge 200, Kendro, Alemania) a $2000 \times g$ durante 5 minutos y posteriormente lavadas dos veces con buffer fosfato salino (PBS, K_2HPO_4 0,87 g/l, KH_2PO_4 0,68 g/l, NaCl 8,77 g/l, pH 7,5). El pellet resultante de cada cultivo fue re-suspendido en jugo de manzana estéril de 12 °Brix hasta alcanzar una DO_{550} de 0,125 ($\approx 10^6$ células/ml) medida con un espectrofotómetro de luz visible.

Para ambas especies bacterianas, los viales (guardados hasta el momento de su uso a -70°C) fueron re-suspendidos en Caldo Trypticasa Soja (TSB, Difco, Detroit, MI) a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Las células de cada cultivo fueron separadas por centrifugación

(Labofuge 200, Kendro, Alemania) a 5000 x g durante 10 minutos y posteriormente lavadas dos veces con solución PBS. El pellet resultante de cada cultivo fue re-suspendido en jugo de manzana estéril de 12 °Brix hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0,250 ($\approx 10^8$ células/ml) medida con un espectrofotómetro de luz visible.

2.2 Ensayos de supervivencia de bacterias patógenas en jugo de manzana

Para adherirse a las superficies industriales y posteriormente formar un biofilm, debe asegurarse que las especies sobrevivan en la matriz alimentaria en estudio, en este caso, jugo de manzana. Las levaduras fueron aisladas de estos sistemas lo cual se considera hecho probatorio de su supervivencia, por lo tanto nos centraremos en las bacterias patógenas. Como se mencionó en la sección 2.4 del Capítulo 1¹, el jugo de manzana utilizado es de carácter ácido con un pH de $4,3 \pm 0,2$, con lo cual las células bacterianas tienen que sobrevivir bajo estas condiciones de acidez como paso previo para adherirse. Para estudiar la supervivencia de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. en jugo de manzana se realizaron las suspensiones celulares como se describió en 2.1. Las mismas fueron cultivadas a 25 ± 1 °C² durante 4, 18 y 24 horas. Como control se realizaron cultivos en caldo TSB a pH equivalente al jugo de manzana y e incubados a 37 ± 1 °C. El pH fue ajustado adicionando HCl 0,1 M.

2.3 Pre-adaptación de las bacterias patógenas en jugo de manzana

Un caso interesante es estudiar el potencial escenario de la contaminación de instalaciones industriales con cepas pre-adaptadas a la condición de acidez impuesta por el jugo de manzana, como podría suceder por ejemplo durante el procesamiento, o en la etapa de transporte. 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 stress. Para esto se realizaron suspensiones de 10^8 células/ml de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. en jugo de manzana (pH $4,3 \pm 0,2$) y se cultivaron durante 4 horas a 25 ± 1 °C. Si bien no es la temperatura óptima de incubación de *E. coli* O157:H7 y de *Salmonella* sp., se utilizó dicha temperatura de manera de reproducir la encontrada en el proceso productivo de las industrias jugueras. Posteriormente dichas suspensiones *pre-adaptadas* fueron centrifugadas a 5000 x g

¹ Ver página 25.

² Temperatura de incubación seleccionada de manera de reproducir la encontrada en el proceso productivo de las industrias jugueras.

durante 10 minutos y el pellet nuevamente re-suspendido en jugo de manzana estéril. La supervivencia de las mismas se determinó luego de ser cultivadas a 25 ± 1 °C durante 4, 18 y 24 horas y se compararon los resultados con los obtenidos en la sección 2.2.

Al cabo de cada tiempo las muestras fueron analizadas por recuento en placa. Para esto un mililitro de la muestra y sus correspondientes diluciones seriadas se utilizaron para los recuentos en agar Trypticase Soja (TSA, Difco, Detroit, MI) por técnica de agar volcado. Las placas de TSA fueron incubadas a 37 ± 1 °C durante 48 horas. Cada muestra fue analizada por triplicado.

2.4 Ensayos de co-agregación y auto-agregación

Como se mencionó anteriormente, para evaluar posibles interacciones bacteria-levadura, se procedió a realizar ensayos de co-agregación. También se realizaron ensayos de auto-agregación de manera de tener una perspectiva de la posible incidencia de un proceso de sedimentación.

Para los ensayos de co-agregación se utilizaron suspensiones celulares en jugo de manzana de 12 °Brix de 10^8 células/ml de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp., y de 10^6 células/ml de *Candida tropicalis* y *Candida krusei*.

Para cada par bacteria/levadura se mezclaron volúmenes iguales (2,5 ml) de cada una de las suspensiones celulares ajustadas, y se incubaron a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) sin agitación. La absorbancia de cada par (*C. tropicalis*/*E. coli* O157:H7, *C. tropicalis*/*Salmonella* sp., *C. krusei*/*E. coli* O157:H7 y *C. krusei*/*Salmonella* sp.) fue monitoreada durante 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Al cabo de cada tiempo, 0,2 ml de la superficie se tomaron con la precaución de no perturbar la suspensión y se midieron en un espectrofotómetro de luz visible a una DO de 600 nm.

El % de co-agregación fue calculado de acuerdo a la fórmula de Malik y col. (2003) con algunas modificaciones:

$$[(DO_{bacteria} + DO_{lev}) - (DO_{mezcla}) / (DO_{bacteria} + DO_{lev})] \times 100$$

donde, $DO_{bacteria} + DO_{lev}$ representan las absorbancias de la mezcla bacteria/levadura en el tiempo 0 minutos, y DO_{mezcla} refleja la absorbancia de las suspensiones en cada uno de los tiempos analizados.

Por otro lado, para determinar el efecto de la sedimentación de cada una de las especies en el proceso global de co-agregación, se estudiaron las auto-agregaciones de *C.*

tropicalis, *C. krusei*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. como se describe en Collado y col. (2008) a través del % de auto-agregación (A%). Para esto se prepararon suspensiones celulares de cada una de las especies en jugo de manzana de 12 °Brix de la misma forma que se menciona en el protocolo de co-agregación. Las suspensiones de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. fueron incubadas a temperatura ambiente ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) durante 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Al cabo de cada tiempo, sin perturbar las suspensiones, se tomaron 0,2 ml de la superficie y se midió su absorbancia a 600 nm. El % de auto-agregación se calculó a través de la fórmula:

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

donde A_0 representa la DO_{600} en el minuto 0 y A_t representa la DO_{600} en los restantes tiempos (5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos).

2.5 Formación de biofilms multiespecie

Una vez establecida la supervivencia de las bacterias patógenas en el jugo de manzana y conocidas las interacciones bacteria-levadura en suspensión, se ensayaron las casuísticas que se mencionan a continuación:

2.5.1. Ensayos de adhesión levadura-bacteria

Para los ensayos de colonización se utilizó como sustrato de adhesión cupones de acero inoxidable AISI 304 L y como matriz biológica suspensiones celulares ajustadas en jugo de manzana de 12 °Brix de *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933) y *Salmonella* sp.

Para determinar el efecto de las relaciones inter-específicas levadura/bacteria en el proceso de adhesión a superficies como el AI, diferentes condiciones fueron ensayadas: a) Co-adhesión levadura/bacteria, b) Incorporación de bacterias a un biofilm pre-formado de levaduras y c) Ensayo de cultivos con sobrenadantes de levaduras y bacterias.

Para poder observar el efecto de dichas condiciones, se analizó el comportamiento de cada especie por separado, como referencia. Para esto, las suspensiones celulares ajustadas de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. fueron

preparadas como se detalla en la sección 2.1 y los ensayos de adhesión se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.6 de Capítulo 1³.

Las suspensiones bacterianas en cada uno de los ensayos detallados en esta sección se realizaron con células pre-adaptadas 4 horas en jugo de manzana de 12 °Brix a 25 ± 1 °C tal como se detalla en la Sección 2.3.

En general, para cada una de las situaciones se pusieron en contacto suspensiones celulares ajustadas con segmentos de AI en cajas de Petri subdivididas como se detalla en la sección 2.6 del Capítulo 1 (“Ensayos de adhesión sobre acero inoxidable”). Al cabo de cada tiempo los segmentos fueron cuidadosamente removidos, lavados dos veces con 5 ml de PBS durante 1 - 2 minutos cada vez bajo agitación (50 rpm) para remover las células débilmente adheridas y/o no adheridas.

En todos los casos, los pares superficie/suspensión fueron cultivados a 25 ± 1 °C durante 24 horas bajo condiciones estáticas.

Al cabo de cada ensayo se destinaron segmentos de AI para su análisis por microscopía de epifluorescencia, SEM y recuentos. Para los recuentos de células viables se colocaron los segmentos en tubos de ensayo con perlas de vidrio y se los agitó a máxima velocidad durante 3 minutos con vórtex (con la finalidad de desprender los microorganismos adheridos a la superficie). Las correspondientes diluciones seriadas se utilizaron para realizar los recuentos en agar YGC en el caso de *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, por técnica de agotamiento en superficie y agar TSA para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp., por técnica de agar volcado. Las placas fueron incubadas a 25 ± 1 °C y 35 ± 1 °C, respectivamente durante 24 a 48 horas. Los resultados fueron expresados como UFC/ cm².

Los diferentes escenarios analizados explican en detalle a continuación:

Co-adhesión levadura/bacteria

El efecto neto de la interacción directa levadura/bacteria se ensayó colocando volúmenes iguales de las suspensiones celulares ajustadas de cada una de las especies, *C. tropicalis* y *C. krusei* (10^6 células/ml), y *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. (10^8 células/ml). Cada uno de los pares levadura/bacteria (*C. tropicalis*/*E. coli* O157:H7, *C. tropicalis*/*Salmonella* sp, *C. krusei*/*E. coli* O157:H7 y *C. krusei*/*Salmonella* sp.) fueron cultivados durante 24 horas a 25 ± 1 °C.

³ Ver página 28.

Biofilm pre-formado de levaduras

Un escenario potencial que pueden enfrentar las bacterias patógenas cuando ingresan a las plantas procesadoras de jugos de fruta es la presencia de una superficie ya colonizada, en este caso, por levaduras. En primer lugar, se pusieron en contacto los segmentos de AI con suspensiones celulares ajustadas de *C. tropicalis* y *C. krusei* durante 8 horas a 25 ± 1 °C, luego fueron removidos y lavados para remover las células débilmente adheridas y/o no adheridas. Posteriormente los mismos segmentos fueron puestos en contacto con suspensiones celulares ajustadas de las bacterias patógenas. Las mismas fueron incubadas a 25 ± 1 °C durante 16 horas (completando las 24 horas del ensayo).

Ensayo con sobrenadantes

La presencia de posibles moléculas inhibidoras con actividad antimicrobiana se ensayó utilizando sobrenadantes libres de células. Para la obtención de los mismos cada especie fue cultivada como se detalla en la Sección 2.1⁴ y los sobrenadantes fueron colectados por centrifugación a 5000 x g por 10 minutos y luego esterilizados por microfiltración utilizando membranas de 0,45 µm de tamaño de poro (Metricel® Grid, GelmanSciences, MI, EE.UU.). El medio resultante contiene todas las moléculas liberadas durante el crecimiento celular.

Para observar el efecto de los sobrenadante libres de células sobre la adhesión de los microorganismos, se colocaron volúmenes iguales de (i) suspensiones celulares ajustadas de cada especie de levadura y (ii) sobrenadantes de bacterias patógenas. El caso inverso también se ensayó, donde las suspensiones ajustadas de las bacterias patógenas se expusieron a sobrenadantes de las levaduras. En todos los casos la relación suspensión ajustada:sobrenadante fue de 1:1.

2.6 Análisis estadístico

En los casos en donde se realizaron recuentos las UFC fueron transformadas a unidades logarítmicas quedando expresadas como Log UFC/cm^2 , para aproximarla a la hipótesis de distribución normal.

En todos los casos los análisis se realizaron por triplicado bajo las mismas condiciones en dos ensayos independientes y los resultados se expresaron como Media y Desvío Estándar (Media \pm DE).

⁴ Ver página 66.

Se realizó un test t-Student cuando fue apropiado para la comparación de medias y se consideraron como resultados estadísticamente significativos aquellos con un nivel de confianza igual o mayor al 95 % ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Ensayos de supervivencia de bacterias patógenas en jugo de manzana

En la Figura 3.1 se muestra la supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. incubadas a 25 °C durante 24 horas en jugo de manzana de 12 °Brix (pH 4,3 ± 0,2). La población de células viables de *E. coli* O157:H7 sufrió una reducción significativa ($p < 0,05$) cuando fue enfrentada a un medio ácido como lo es el jugo de manzana, independientemente de una previa adaptación. En cuanto a la población de células ácido adaptadas (AA) de *E. coli* O157: H7, la misma disminuyó 2,90 Log UFC/ml a las 18 horas y 2,72 Log UFC/ml a las 24 horas, mientras que la disminución de las células no adaptadas (NA) fue de 4,7 Log UFC/ml a las 18 horas y 4,6 Log UFC/ml a las 24 horas. Por otro lado, la supervivencia al ácido de *Salmonella* sp. no dependió de una previa exposición a pH ácido, no encontrándose diferencias significativas entre AA y NA a las 24 horas de incubación en jugo de manzana. Los recuentos alcanzados para el caso de *Salmonella* sp. fueron de 8,0 (AA) y 8,4 Log UFC/ml (NA), al cabo de 24 horas. A diferencia de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp. no sólo superó la condición ácida sino que también aumentó su número rápidamente entre las 4 y 18 horas de incubación.

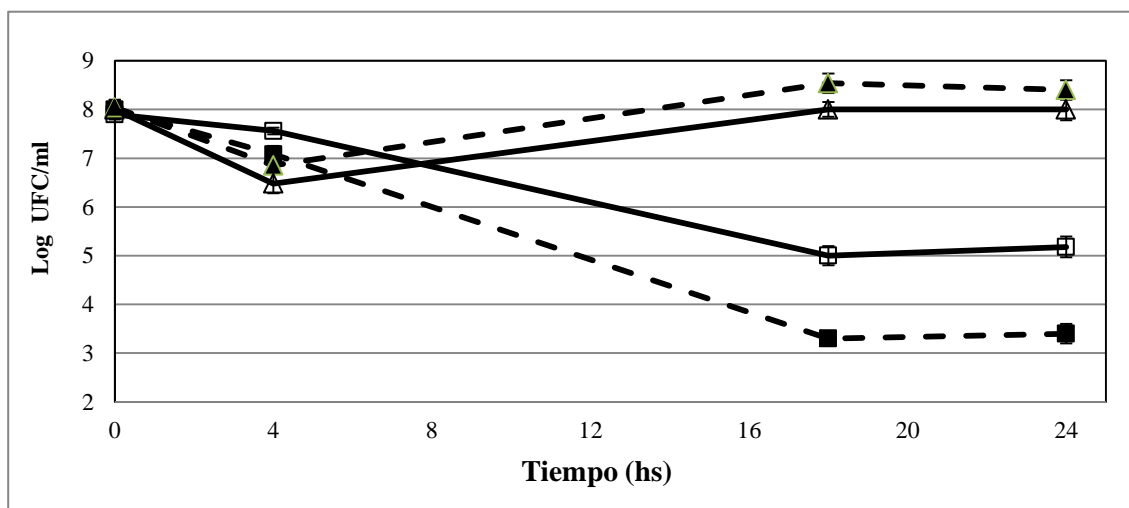


Figura 3.1: Estudio de la supervivencia de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. en jugo de manzana de 12 °Brix (pH 4,3 ± 0,2) durante 24hs a 25°C. (□) células adaptadas de *E. coli* O157:H7, (■) células no adaptadas *E. coli* O157:H7 y (△) células adaptadas de *Salmonella* sp., (▲) células no adaptadas de *Salmonella* sp. Se graficó la media ± DE.

3.2 Ensayos de agregación

Definiendo la co-agregación como un descenso de más del 20% en la DO_{600} , relativo a la DO_{600} inicial (Furukawa y col. 2011) en la Tabla 3.1 se muestran las co-agregaciones entre *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. con *C. krusei* y *C. tropicalis*. A lo largo de los

tiempos analizados el fenómeno de co-agregación se da a partir de los 5 minutos de contacto. En el caso de *C. tropicalis* los valores de co-agregación parten del 84% para *E. coli* O157:H7 y de 56% para *Salmonella* sp.; valores similares se dan en el caso de *C. krusei* en donde la asociación levadura-bacteria para tiempos equivalentes al anterior resulta en un % de asociación de 83% y 66%, respectivamente. Como puede verse en la Tabla 3.1 los mayores porcentajes se observaron con *E. coli* O157: H7, tanto en el caso de *C. krusei* como de *C. tropicalis*, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) a lo largo de los distintos tiempos muestreados. Analizando lo sucedido con *Salmonella* sp. (con ambas especies de levaduras) los % de co-agregación ascendieron del 56 al 69% (*C. tropicalis*) y del 66 al 76% (*C. krusei*), de los 5 a los 120 minutos de ensayo. Finalizado el ensayo (120 minutos) se tomaron muestras de los tubos y luego de una previa tinción de Gram se observaron por microscopia óptica (Primo Star-Zeiss, Goettingen, Alemania). En ambos casos se observaron patrones similares los cuales se muestran en la Figura 3.2, en donde se pueden ver las células bacterianas adheridas a las células levaduriformes y/o pseudohifas.

De manera de evaluar si los coeficientes de co-agregación se debían a un proceso de auto-agregación y sedimentación, se calcularon los porcentajes de auto-agregación (A%) para cada una de las especies intervinientes. Los A% se muestran en la Tabla 3.2, para los intervalos de tiempo muestreados las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a los % de co-agregación.

Tabla 3.1. Porcentajes de co-agregación de *Candida krusei* y *Candida tropicalis* con *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. a lo largo de 120 minutos de ensayo. Los cultivos fueron realizados en jugo de manzana de 12 °Brix y los resultados expresados como el porcentaje medio \pm DE.

Tiempo (min)	<i>Candida krusei</i>		<i>Candida tropicalis</i>	
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> sp.	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> sp.
5	83 \pm 1,0	66 \pm 1,1	84 \pm 1,0	56 \pm 2,8
10	83 \pm 0,9	67 \pm 1,0	84 \pm 0,8	57 \pm 0,4
15	83 \pm 0,9	67 \pm 1,0	84 \pm 0,8	66 \pm 1,2
30	83 \pm 1,0	67 \pm 1,0	85 \pm 0,8	67 \pm 1,6
60	83 \pm 0,6	67 \pm 1,1	85 \pm 0,6	68 \pm 1,6
90	83 \pm 0,8	69 \pm 1,5	85 \pm 0,6	68 \pm 2,1
120	84 \pm 0,6	76 \pm 1,9	86 \pm 0,4	69 \pm 1,4

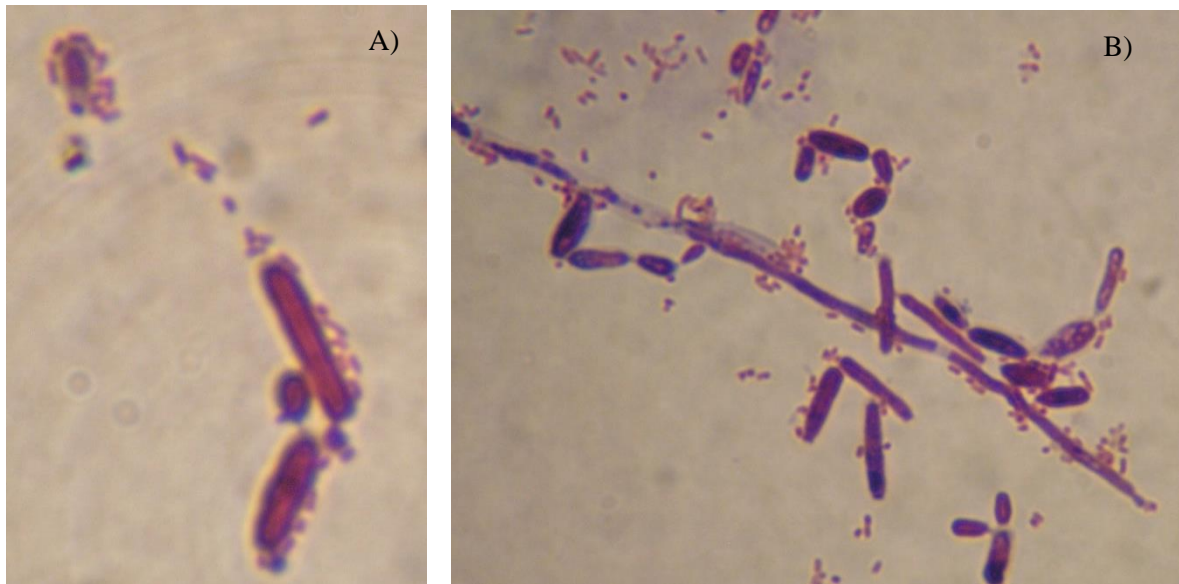


Figura 3.2. Imágenes por microscopía óptica (tinción Gram) de cultivos de 120 minutos de: (a) *Candida krusei* y *Escherichia coli* O157:H7, (b) *Candida tropicalis* y *Salmonella* sp. Aumento: 100x.

Tabla 3.2. Porcentajes de auto-agregación de *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. expresadas como media \pm DE.

Tiempo (min)	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> sp.
5	5 \pm 1,1	5 \pm 5,3	4 \pm 0,2	1 \pm 0,4
10	5 \pm 0,9	6 \pm 4,1	3 \pm 0,4	5 \pm 3,5
15	6 \pm 0,4	8 \pm 2,3	5 \pm 0,2	5 \pm 3,7
30	32 \pm 2,2	14 \pm 0,8	5 \pm 0	6 \pm 4,5
60	50 \pm 0,1	48 \pm 0,6	7 \pm 0,1	6 \pm 5,1
90	52 \pm 2,9	60 \pm 4,2	8 \pm 0,4	49 \pm 4,7
120	65 \pm 1,3	69 \pm 2,3	7 \pm 0,6	56 \pm 3,3

3.3 Formación de biofilms

Una vez determinada la supervivencia de las especies y la interacción entre los pares levadura/bacteria (resultados mostrados en las Secciones 3.1 y 3.2), el paso siguiente fue realizar los ensayos de adhesión. Siguiendo el mismo eje, primero se evaluó cada especie por separado y luego se plantearon las posibles casuísticas de interacción entre ambas.

3.3.1 Adhesiones: mono cultivos bacterias-levaduras

En función a lo mencionado en el párrafo anterior, el número de células adheridas de *E. coli* O157:H7 a las superficies de AI a lo largo de las 2, 8, 16 y 24 horas de ensayo variaron entre 4,98 y 6,59 Log UFC/cm² mientras que en el caso de *Salmonella* sp. las adhesiones fueron de entre 6,00 y 6,69 Log UFC/cm². En cuanto a las especies de levaduras, los recuentos aumentaron de 5,66 a 6,74 Log UFC/cm² para *C. tropicalis* y en el caso de *C. krusei* de 5,48 a 6,20 Log UFC/cm². En la Tabla 3.3 se detallan los recuentos para cada una de las especies en cada tiempo ensayado.

Tabla 3.3: Número de células adheridas de *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. sobre acero inoxidable a lo largo de 2, 8, 16 y 24 horas de ensayo. Los mismos fueron realizados en jugo de manzana de 12 °Brix. Los resultados están expresados como media ± DE.

Tiempo (hs)	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> sp.
2	5,66±0,03	5,48 ± 0,26	4,98 ± 0,12	6,00 ± 0,09
8	6,26±0,08	5,50 ± 0,10	6,54 ± 0,15	6,22 ± 0,09
16	6,58±0,03	5,84 ± 0,09	6,59 ± 0,19	6,51 ± 0,02
24	6,74±0,01	6,20 ± 0,01	6,59 ± 0,002	6,69 ± 0,07

Asimismo, en las Figuras 3.3 y 3.4 se muestran imágenes de SEM de las adhesiones de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp., respectivamente, sobre AI. En los primeros tiempos se observan células aisladas que a las 16 y 24 horas de contacto se distribuyen a lo largo de la superficie, comenzando a formar pequeñas agrupaciones celulares. Conjuntamente en la Figura 3.5 se ven las células de *Salmonella* sp. (A y C) y *E. coli* O157: H7 (B y D) unidas a las superficies y/o a otras células, además de observarse la presencia de estructuras tipo flagelos o fimbrias. En el caso de *Salmonella* sp. se observó un mayor desarrollo de estas estructuras de anclaje en comparación con *E. coli* O157: H7.

Por otro lado, analizando el caso de las levaduras (*C. tropicalis* y *C. krusei*) se corroboró lo esperado, una gran cobertura de la superficie dentro de las 24 horas del ensayo. *Candida tropicalis* mostró un gran desarrollo de pseudohifas en comparación con *C. krusei*, que si bien también puede formarlas, las mismas son de menor extensión. Se ha establecido (Baillie y Douglas 1999; Ramage y col. 2002) que la presencia de pseudohifas en los biofilms tiene relevancia desde el punto de vista de la integridad de los mismos, especialmente cuando se trata de estructuras multi-capas.

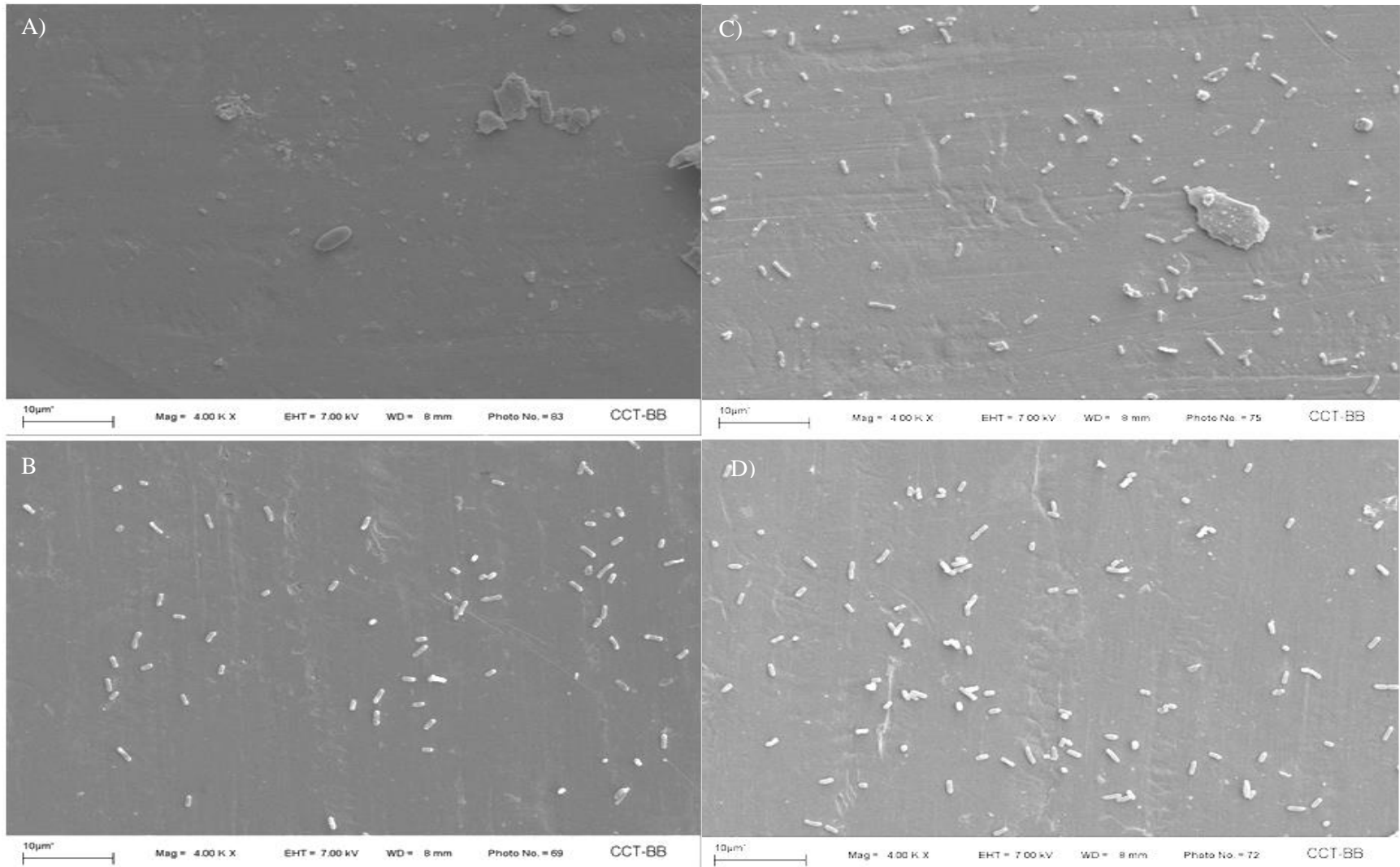


Figura 3.3: Imágenes de SEM de la adhesión mono-especie de *Escherichia coli* O157:H7. A) 2hs, B) 8hs, C) 16hs y D) 24hs. Las adhesiones se realizaron sobre acero inoxidable AISI 304 e incubadas en jugo de manzana de 12 °Brix a 25°C.

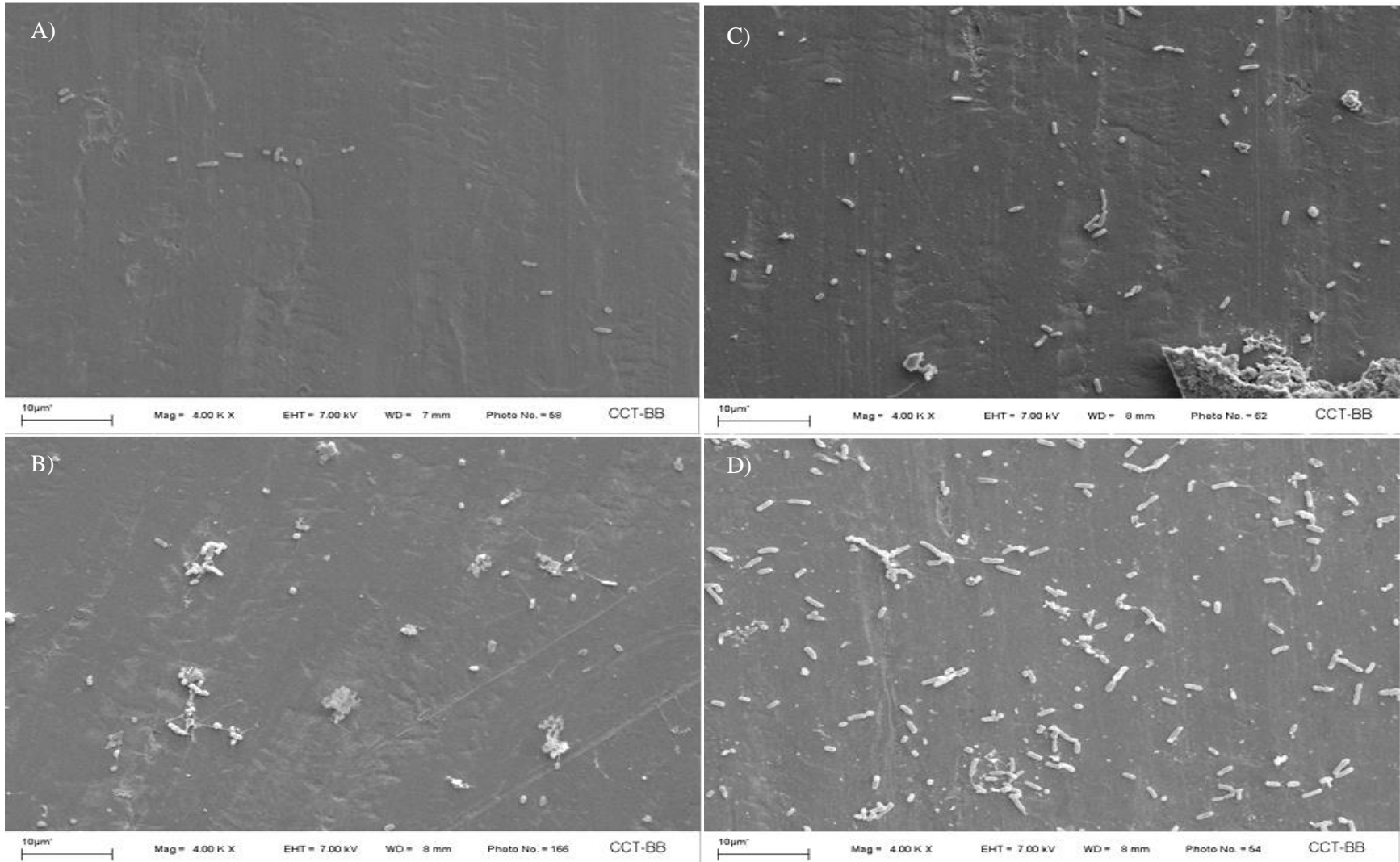


Figura 3.4: Imágenes de SEM de la adhesión mono-especie de *Salmonella* sp. A) 2hs, B) 8hs, C) 16hs y D) 24hs. Las adhesiones se realizaron sobre acero inoxidable AISI 304 e incubadas en jugo de manzana de 12°Brix a 25°C.

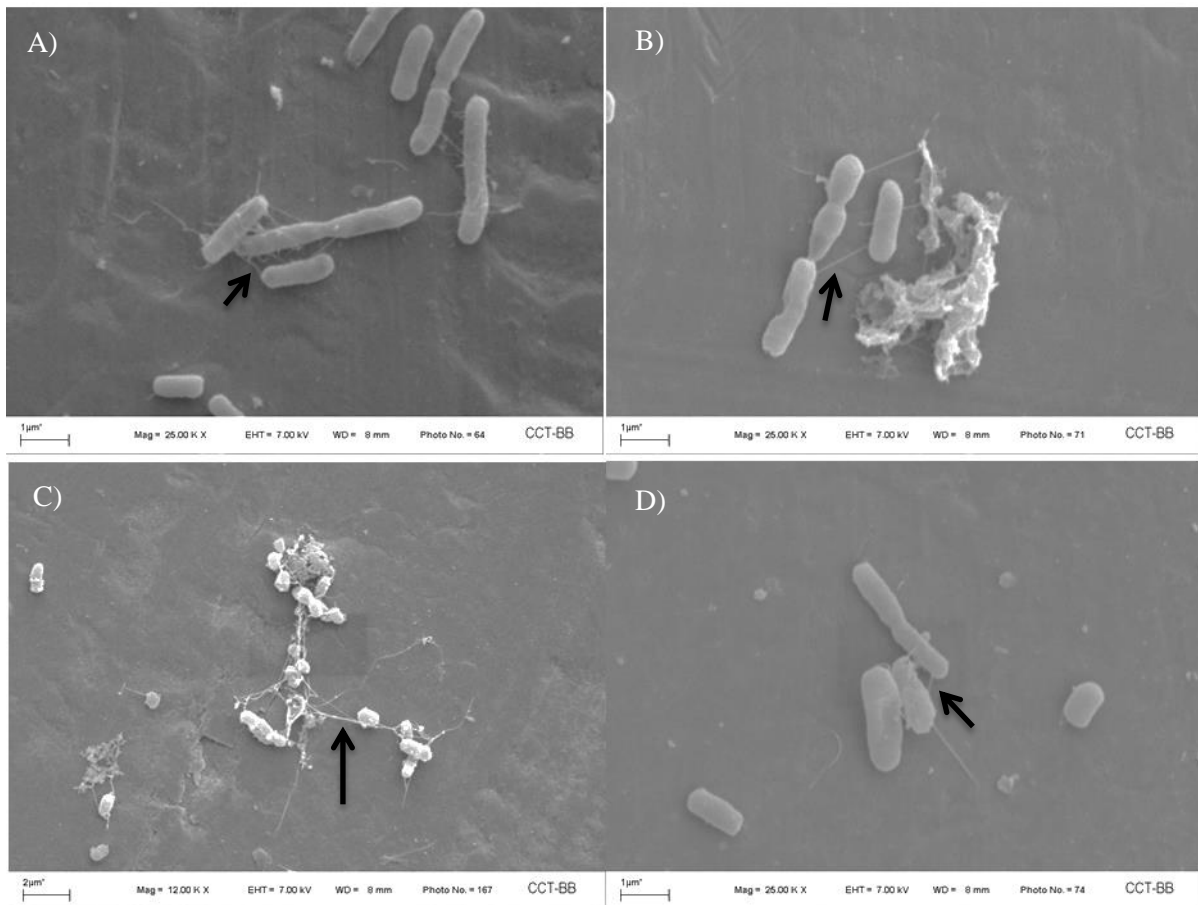
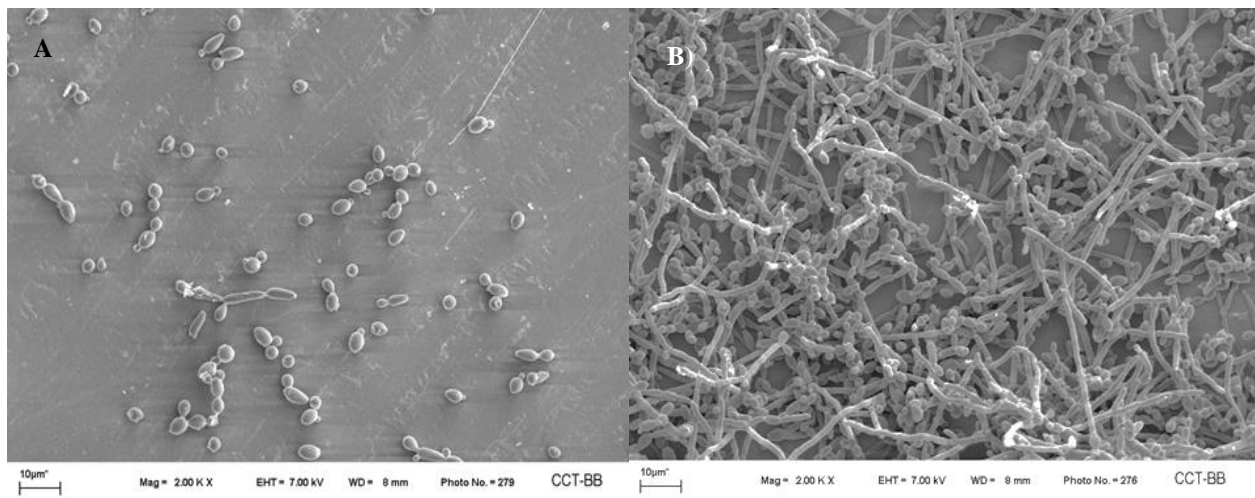


Figura 3.5: Imágenes de SEM de los cultivos de bacterias en donde se pueden apreciar las estructuras de anclaje utilizadas por *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* O157: H7 para las adhesiones célula-célula y / o célula-superficie. Primera fila: 16 horas de exposición, segunda fila: 24 horas de exposición. (A y C) *Salmonella* sp. y (B y D) *E. coli* O157: H7.

En la Figura 3.6 se puede observar el gran desarrollo de los cultivos mono especie de *Candida tropicalis* sobre AI y tal como puede verse en la Tabla 3.3 los recuentos alcanzados en los distintos tiempos variaron entre 5,66 y 6,74 Log UFC/cm². A las 2 horas de contacto de esta especie se observó una primera adhesión al AI por parte de blastosporas (células de levaduras) para luego comenzar a multiplicarse de forma continua transformándose en pseudohifas que desarrollaron estructuras tridimensionales. Por el contrario, *C. krusei* a pesar de ser la especie con mayor número de aislamientos (Ver Capítulo 1) a tiempos equivalentes, tuvo una menor adhesión y colonización que *C. tropicalis* (Tabla 3.3). Las adhesiones variaron entre $5,48 \pm 0,26$ y $6,20 \pm 0,01$ Log UFC/cm². Tal como se ve en la Figura 3.7 a partir de las 16 horas de contacto comienzan a

formarse pequeñas cadenas de células; a pesar de esto no llegan a ser lo suficientemente grandes como para cubrir toda la superficie más aún si se compara con el desarrollo de *C. tropicalis*.

Las estructuras tridimensionales de los biofilms están formadas por una combinación de blastosporas, pseudohifas e hifas. A partir de estas estructuras que les confieren estabilidad, los biofilms maduros les permiten a las especies del género *Candida* adherirse y proliferar con éxito. Cuanto mayor la presencia de hifas y pseudohifas, mayor es el potencial invasivo tienen los biofilms. Dichas estructuras pueden atravesar la sección transversal del biofilm y de cierta manera mantener comunicadas a las distintas capas. Entre los factores que influyen la estructura de los biofilms están aquellos de origen ambiental como condiciones de crecimiento y naturaleza de la superficie colonizada (Hawser y Douglas 1994; Chandra y col. 2001; Jain y col. 2007), pero desde la perspectiva de este estudio uno de los puntos más importantes es tener en cuenta la naturaleza de las especies involucradas y sus interacciones (Hawser y Douglas 1994; Chandra y col. 2001; Kuhn y col. 2002; Parahitiyawa y col. 2006; Jain y col. 2007).



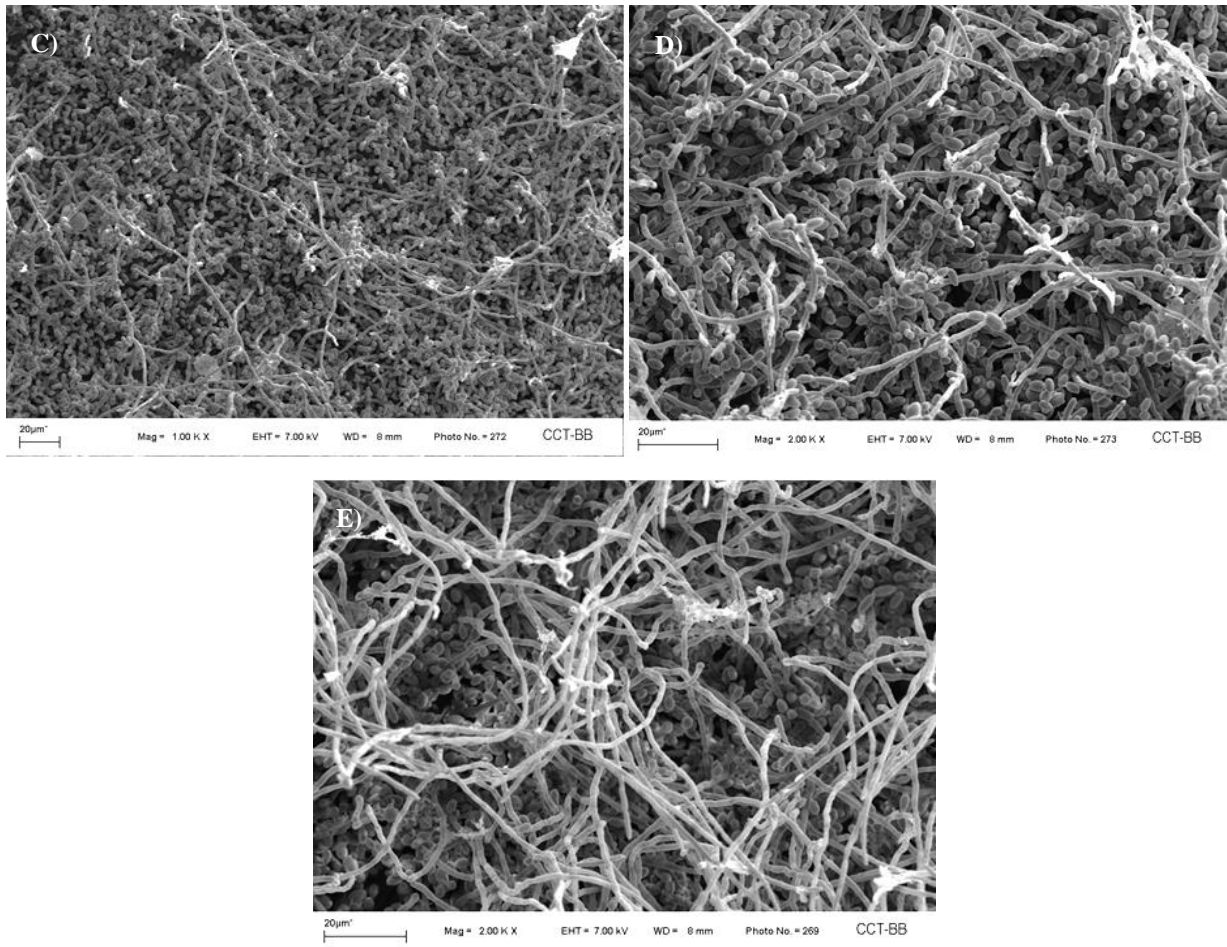
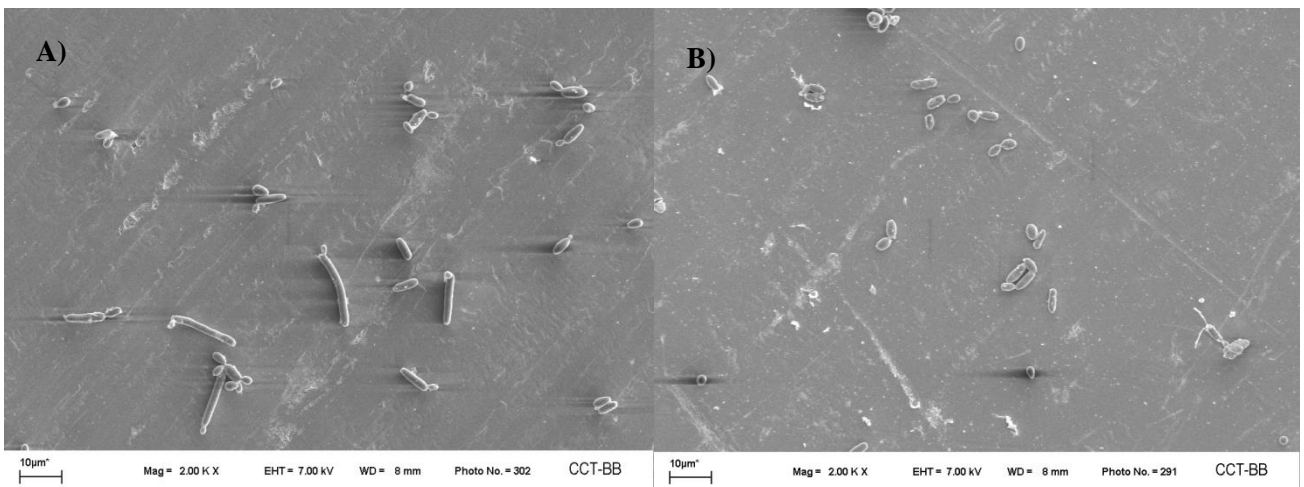


Figura 3.6: Imágenes de SEM de la adhesión mono especie de *Candida tropicalis*. A) 2hs, B) 8hs, C y D) 16hs, E) 24hs. Las adhesiones se realizaron sobre acero inoxidable AISI 304 e incubadas en jugo de manzana de 12°Brix a 25°C.



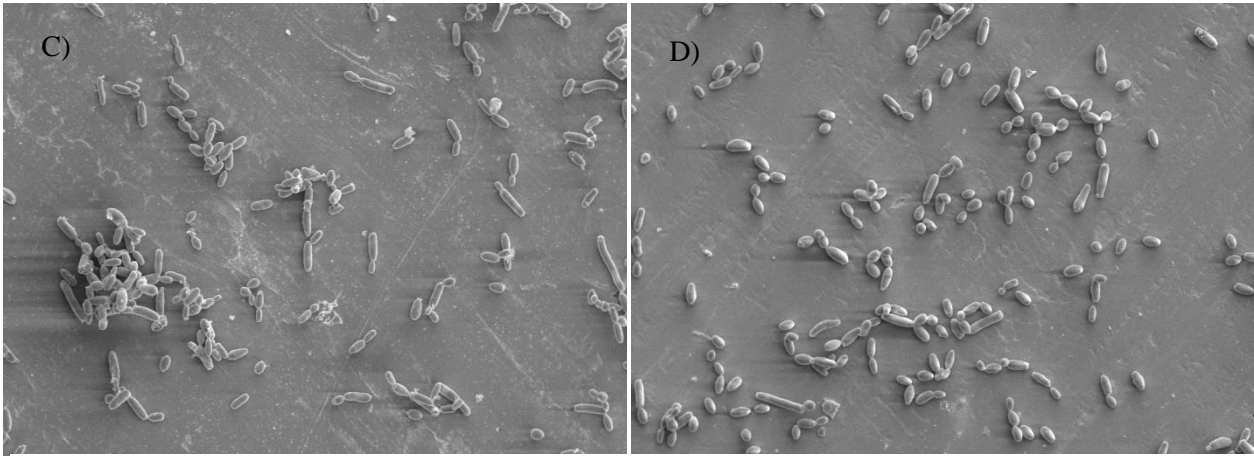


Figura 3.7: Imágenes de SEM de la adhesión mono-especie de *Candida krusei*. A) 2hs, B) 8hs, C) 16hs y D) 24hs. Las adhesiones se realizaron sobre acero inoxidable AISI 304 e incubadas en jugo de manzana de 12°Brix a 25°C.

3.3.2 Adhesiones: cultivos mixtos bacterias-levaduras

Una vez determinada la adhesión de los mono cultivos de bacterias y levaduras sobre AI se estudió el efecto de la interacción entre ambas (cultivos mixtos) en el proceso de formación de biofilms. Dentro de las situaciones ensayadas se encuentran: a) la co-adhesión simultánea por parte de las bacterias y las levaduras, b) la incorporación de las bacterias a células pre-adheridas de *Candida krusei* ó *Candida tropicalis* y c) los cultivos de las células con sobrenadantes.

Co-cultivos bacteria-levadura

Al comparar los datos obtenidos entre las adhesiones de los mono cultivos (Sección 3.3.1) y los co-cultivos entre bacterias – levaduras, los cuales se detallan a continuación, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). En la Figura 3.8 A se observan los resultados del cultivo mixto entre *Candida krusei* y *Salmonella* sp., mientras que en la Figura 3.8 B se exponen los resultados de la interacción con *Escherichia coli* O157:H7. En ambas figuras se puede observar que luego de 24 horas de incubación en la co-adhesión levadura/bacteria se observó un descenso en los recuentos de *Candida krusei* de 0,40 unidades logarítmicas ($p < 0,001$) frente a *E. coli* O157:H7 mientras que el descenso fue de 0,55 unidades logarítmicas en el caso del co-cultivo con *Salmonella* sp. ($p < 0,01$). Estos cambios representan un 7 y 9%, respectivamente, con respecto a los obtenidos para el mono cultivo de la levadura.

En el caso de *Candida tropicalis* se observó que la colonización de las superficies de AI se redujo al exponerse en co-cultivo a *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* sp., tal como lo sugieren las Figuras 3.9 A y B. En los mismos se puede observar que *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* O157:H7 tienen un efecto negativo en la formación de biofilms en donde los recuentos de *C. tropicalis* se reducen en 0,82 y 1,14 unidades logarítmicas, respectivamente.

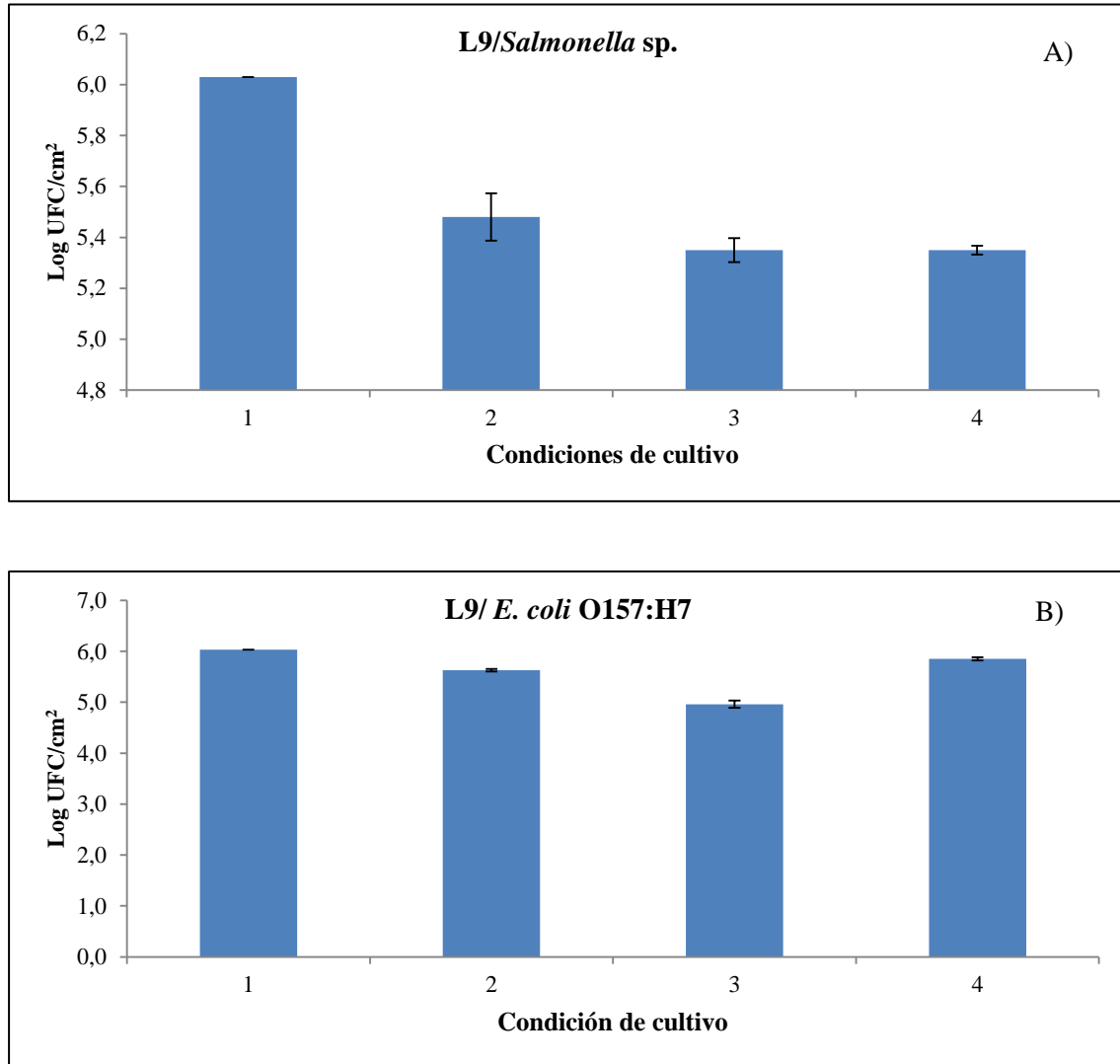


Figura 3.8. Población de células adheridas sobre acero inoxidable (Log UFC/cm²) de *Candida krusei* (L9) en las siguientes situaciones: 1-monocultivo de *C. krusei*, 2- co-cultivo con células bacterianas en relación 1:1, 3- cultivo con sobrenadante bacteriano, 4-incorporación de células bacterianas a biofilm

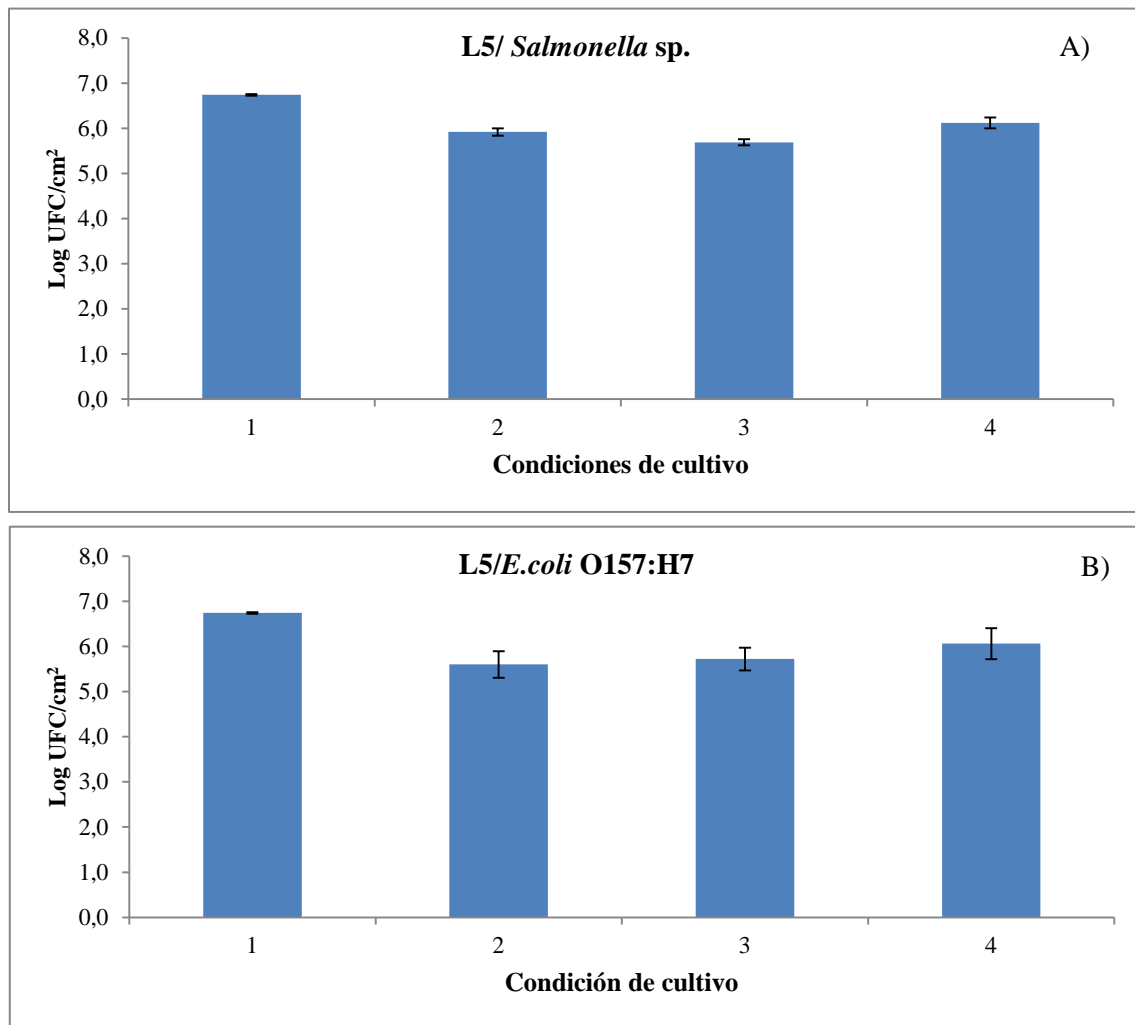


Figura 3.9. Población de células adheridas sobre acero inoxidable (Log UFC/cm²) de *Candida tropicalis* (L5) en las siguientes situaciones: 1-monocultivo de *C. tropicalis*, 2- co-cultivo con células bacterianas en relación 1:1, 3- cultivo con sobrenadante bacteriano, 4-incorporación de células bacterianas a biofilm pre-formado de *C. tropicalis*. Los resultados están expresados como las medias \pm DE. (A) *Salmonella* sp. y (B) *Escherichia coli* O157:H7.

A partir de las imágenes de SEM obtenidas para los co-cultivos se ve que existe una estrecha relación levadura/bacteria. En el caso de *Candida krusei* ambas bacterias muestran una preferencia por las blastosporas más que por el AI (Figura 3.10). Situación similar se observa con los co-cultivos de *Candida tropicalis* en donde las imágenes de SEM (Figura 3.11) muestran cómo las células bacterianas se adhieren a todos los estadios morfológicos: blastosporas y pseudohifas o intercaladas entre ellas.

Por su parte en la Figura 3.12 se aprecia que la interacción mantiene la viabilidad de las especies a partir de la tinción con FDA.

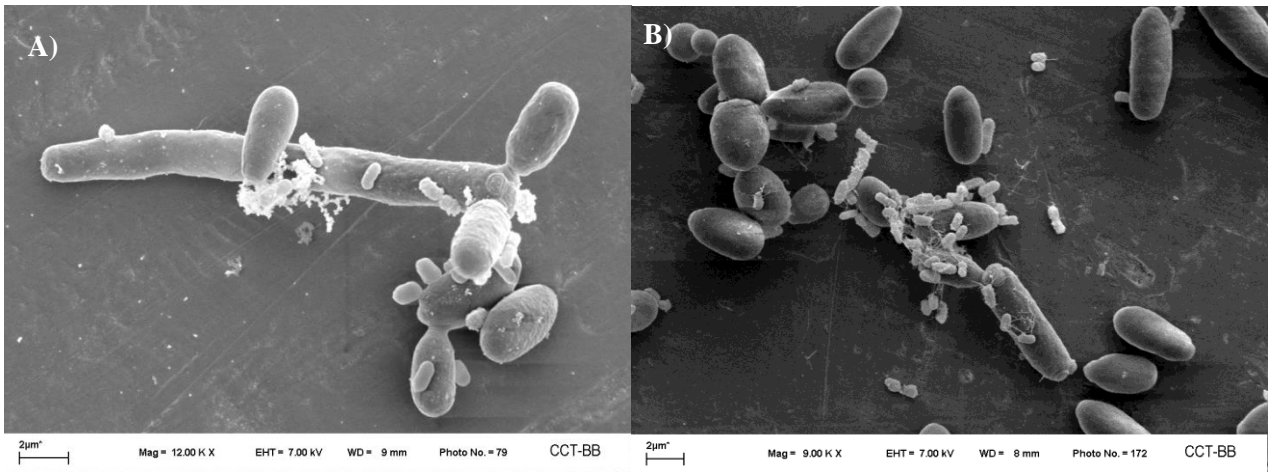


Figura 3.10. Imágenes obtenidas por SEM donde se puede observar la relación entre las células bacterianas y aquellas de *Candida krusei*. (A) co-cultivo con *Salmonella* sp. y (B) co-cultivos con *Escherichia coli* O157:H7.

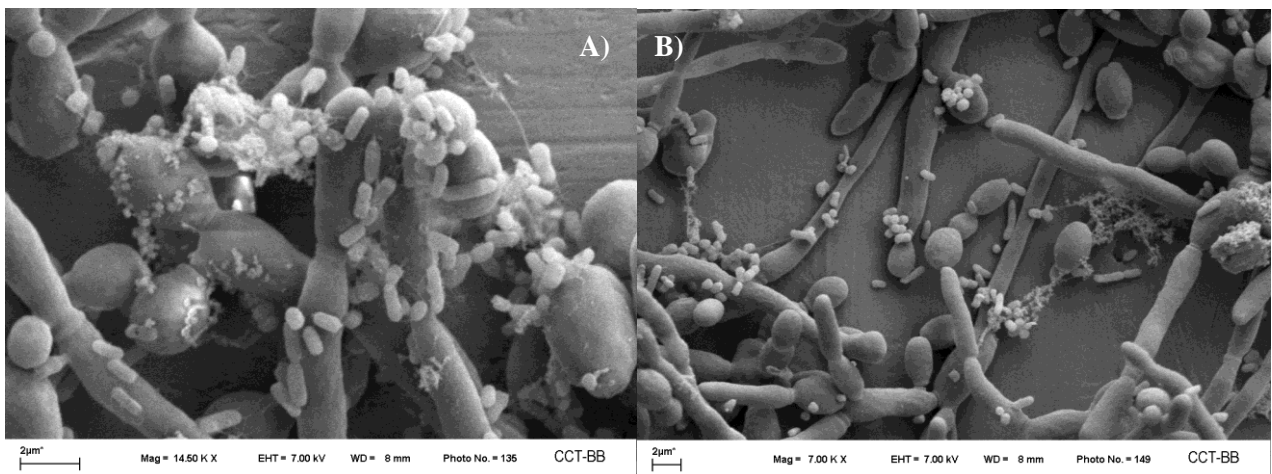


Figura 3.11. Imágenes obtenidas por SEM donde se puede observar la relación entre las células bacterianas y aquellas de *Candida tropicalis*. (A) co-cultivo con *Salmonella* sp. y (B) co-cultivos con *Escherichia coli* O157:H7.

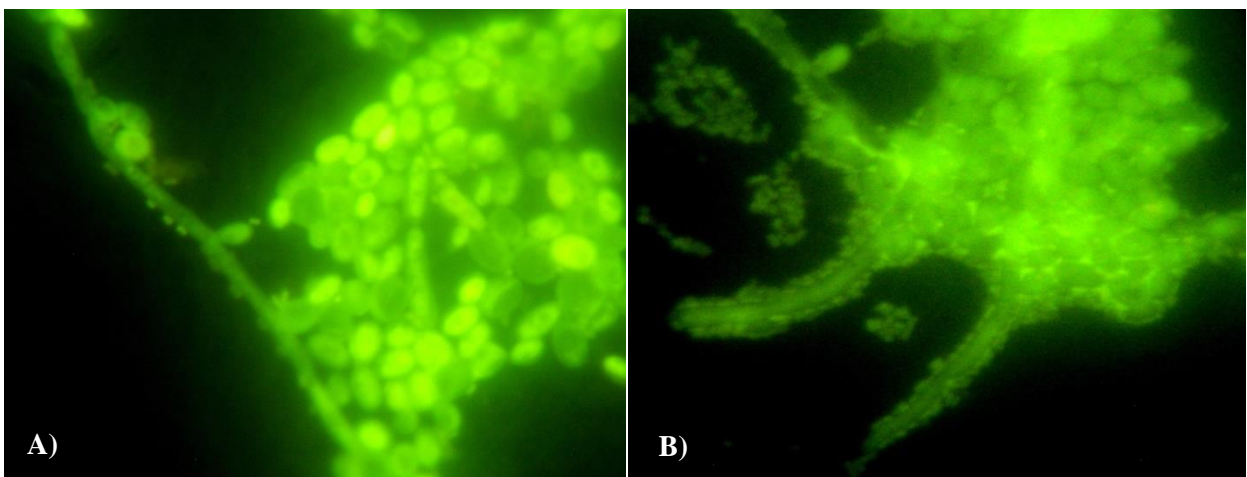
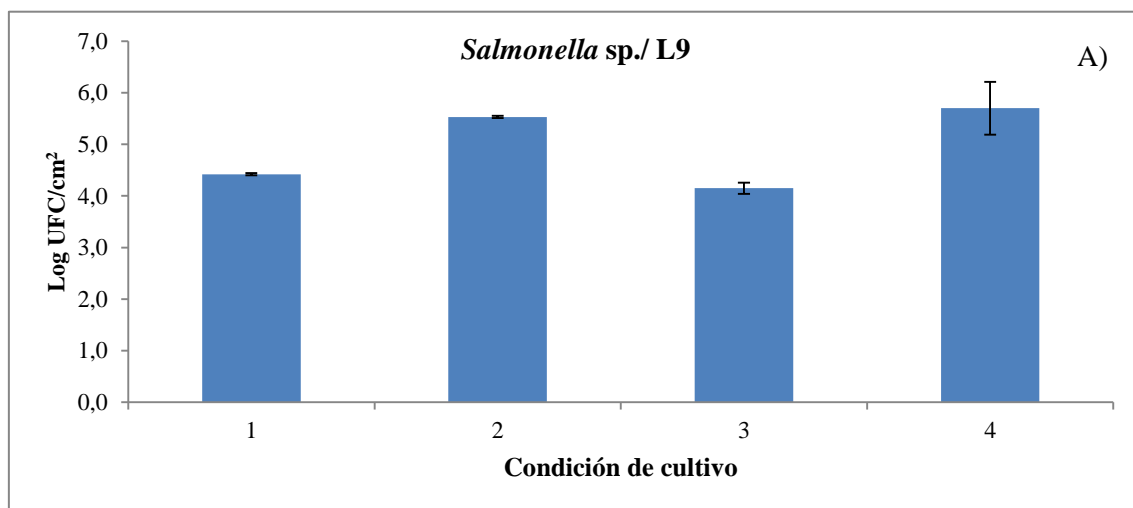


Figura 3.12. Imágenes por microscopía óptica (tinción FDA) de cultivos de 24 hs de: (A) *Candida krusei* y *Escherichia coli* O157:H7, (B) *Candida tropicalis* y *Salmonella* sp. El aumento de las imágenes es de 200x.

Sobrenadantes

Por otro lado, se ensayó el efecto de los sobrenadantes de cada especie de bacteria (medio libre de células) sobre la adhesión de *C. krusei* y *C. tropicalis* (Figuras 3.8 y 3.9 condición número 3). El efecto que se observó para ambos pares de levaduras con los sobrenadantes bacterianos fue negativo ($p < 0,05$). En el caso de *C. krusei* los descensos fueron de 0,68 y 1,07 unidades logarítmicas frente a los sobrenadantes de *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7, respectivamente. En el caso de *C. tropicalis* se observaron reducciones de 1,02 y 1,05 unidades logarítmicas.

El caso inverso también fue ensayado, en donde se observó el comportamiento de las bacterias ante sobrenadantes de levaduras. Como se aprecia en la Figura 3.13 (condición número 3) luego de 24 horas de co-cultivo con sobrenadantes de *C. krusei* las bacterias presentaron una disminución en sus recuentos, las cuales no fueron significativas ($p > 0,05$), con respecto a los valores registrados para los monocultivos. Su capacidad de adhesión al AI sólo varió en 0,1 y 0,27 unidades logarítmicas para los casos de *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7, respectivamente (Figura 3.13 A y B). Contrariamente, frente a los sobrenadantes de *C. tropicalis* tanto *E. coli* O157:H7 como *Salmonella* sp. presentaron aumentos en sus recuentos (Figura 3.14 A y B), los mismos fueron de 1,4 unidades logarítmicas para *E. coli* O157:H7 (30% por encima del valor en los monocultivos), mientras que para *Salmonella* sp. el aumento fue menor, de 1,04 unidades logarítmicas, representando un 24% con respecto al valor de los monocultivos.



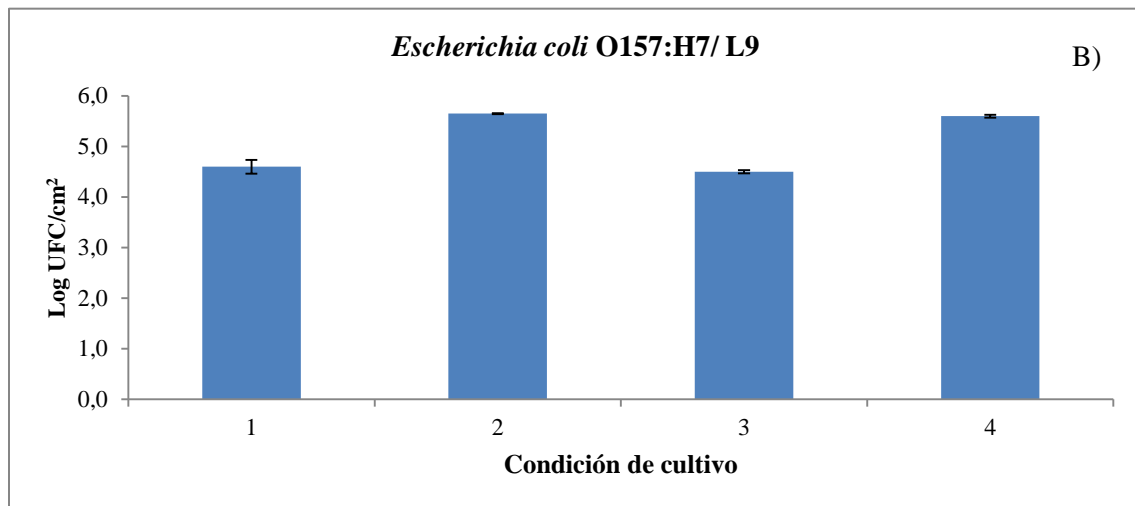
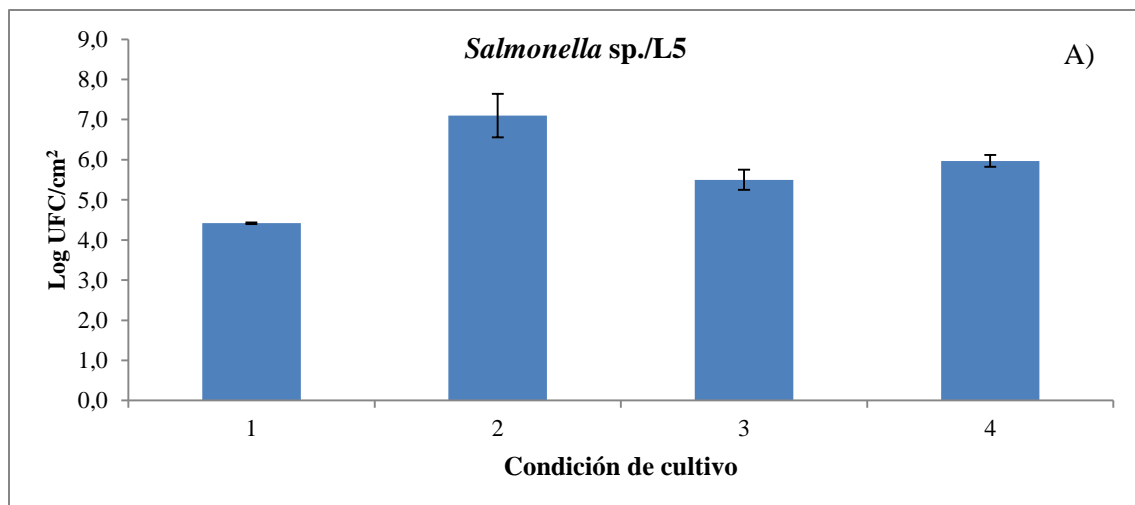


Figura 3.13. Población de células adheridas acero inoxidable (Log UFC/cm²) de (A) *Salmonella* sp. y (B) *Escherichia coli* O157:H7 con co-cultivos de *Candida krusei*. Condiciones de cultivo: 1- monocultivo bacteriano, 2- co-cultivo con células de *Candida krusei* en relación 1:1, 3- cultivo con sobrenadante de la levadura, 4- incorporación de células bacterianas a biofilm pre-formado de *C. krusei*. Los resultados están expresados como las medias \pm DE.



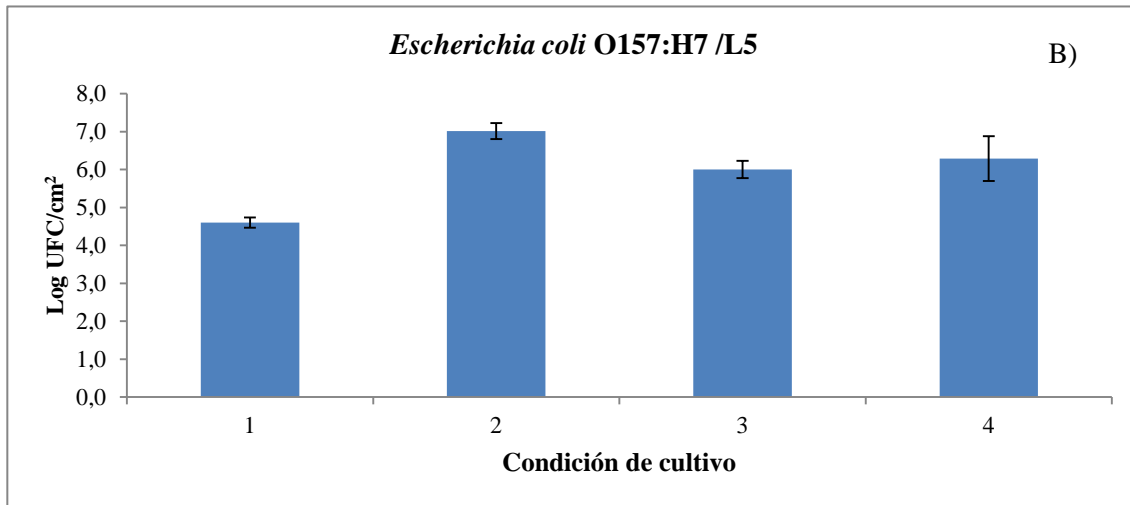


Figura 3.14. Población de células adheridas acero inoxidable (Log UFC/cm²) de (A) *Salmonella* sp. y (B) *Escherichia coli* O157:H7 con co-cultivos de *Candida tropicalis*. Condiciones de cultivo: 1- monocultivo bacteriano, 2- co-cultivo con células de *Candida tropicalis* en relación 1:1, 3- cultivo con sobrenadante de la levadura, 4- incorporación de células bacterianas a biofilm pre-formado de *C. tropicalis*. Los resultados están expresados como las medias \pm DE.

Biofilms pre-formados

Como se estableció en este y otros trabajos previos (Brugnoni y col. 2007; Brugnoni y col. 2012a; Brugnoni y col. 2012b) las levaduras forman parte de la microbiota indígena de los sistemas de producción de jugo de manzana. Por lo tanto, una vez establecido el co-cultivo bacteria/levadura se procedió a analizar lo que sucedería si las bacterias patógenas ingresaban a un sistema ya colonizado por levaduras. Para esto tanto *C. krusei* como *C. tropicalis* fueron puestas en contacto con las superficies de AI durante 8 horas momento en el cual se les agregó una suspensión de bacterias y se las cultivó hasta completar las 24 horas de ensayo. En primer lugar, las diferencias en las adhesiones fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) comparado con los recuentos alcanzados para los mono cultivos de cada especie de levadura. En el caso de *C. krusei* la interacción resultó en un descenso de 0,18 y 0,68 unidades logarítmicas cuando fue expuesta a cultivos *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. (Figura 3.8 A y B condición 4), respectivamente, lo que representa un 3 y un 11%.

Resultados similares se encontraron para *C. tropicalis*, en donde las adhesiones disminuyeron en 0,68 unidades logarítmicas frente a cultivos de *E. coli* O157:H7 y 0,62 unidades logarítmicas con cultivos de *Salmonella* sp. (Figura 3.9 A y B condición 4).

En cuanto a los resultados de los recuentos de bacterias una vez expuestas a biofilms preformados de levaduras, se observa que los recuentos de *Salmonella* sp. ante un biofilm preformado de *Candida krusei* aumentaron 1,28 unidades logarítmicas y los de *E. coli* O157:H7, en 1,00 unidad logarítmica, tal como se ve en las Figuras 3.13 (A y B condición 4). En tanto que en presencia de células pre-establecidas de *Candida tropicalis*, los aumentos fueron de 1,55 unidades logarítmicas para *Salmonella* sp. y 1,69 unidades logarítmicas para *E. coli* O157:H7 (Figura 3.14 A y B condición 4).

En el Anexo 2 se muestran las imágenes de SEM de los biofilms duales levadura/bacteria. Por un lado se presentan lo co-cultivos entre ambos y luego el efecto de los sobrenadantes bacterianos sobre la adhesión y desarrollo de L5 y L9.

4. DISCUSIÓN

El proceso de acidificación ha sido una práctica empleada comúnmente para controlar el crecimiento y la supervivencia de microorganismos patógenos y/o deteriorantes de alimentos (Brown y Booth 1991). A pesar de esto aquellos de naturaleza ácida como pueden ser la sidra (Besser y col. 1993), la mayonesa (Weagant y col. 1994) y el yogur (Morgan y col. 1993), han sido relacionados con brotes producidos tanto por *Escherichia coli* O157:H7 como por *Salmonella* sp.

Los resultados obtenidos de los ensayos realizados con jugo de manzana demuestran este hecho, en donde una previa adaptación a condiciones de acidez aumentó la tolerancia de *E. coli* O157:H7. La adaptación al ácido es un fenómeno por el cual los microorganismos muestran un aumento de resistencia al estrés que representa la exposición a condiciones de pH moderadamente ácidos. Se ha reportado que la adaptación al ácido prolonga la supervivencia de algunos patógenos en diversos sistemas alimentarios con la consecuente implicancia para la seguridad alimentaria (Leyer y Johnson 1997; Tsai y Ingham 1997). La tolerancia al ácido probablemente sea un componente importante en la virulencia de *E. coli* O157:H7 permitiéndole a las células atravesar el tracto gástrico causando la enfermedad. Lo anterior, sumado a su tolerancia y baja dosis infectiva conduce a un grave escenario cuando se encuentra presente este patógeno (Mao y col. 2001).

Por otro lado, la supervivencia en jugo de manzana de las células pre-adaptadas de *Salmonella* sp. fue menor que su contraparte no adaptada; lo mismo fue observado por otros autores (Asplund y Nurmi 1991; Golden y col. 1993; Zhuang y col. 1995; Parish 1997) para una variedad de frutas y verduras de naturaleza ácida. Si bien este mecanismo de adaptación no se conoce con precisión, se puede suponer que es similar al de *E. coli*; su exposición resulta en la generación de numerosas proteínas de choque al ácido (Foster 1991; Foster y Hall 1991).

La razón por la cual se ensayó la supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7 y de *Salmonella* sp. en jugo de manzana se debió a que los microorganismos deben adherirse para luego formar un biofilm, con lo cual tienen que poder superar la barrera que les impone el pH ácido del propio alimento. De esta forma se pretendió aproximar lo que sucede en las industrias a fin de obtener información más realista. Con la automatización de los procesos de producción, las superficies están en contacto repetido con lo que podría

llamarse “jugo crudo”, aumentando el acercamiento entre las bacterias y las superficies, favoreciendo la formación de biofilms.

Otro de los ejes de este capítulo radicó en el estudio de cultivos mixtos por sobre los mono cultivos, de esta forma se intentó aproximar lo que sucede en las industrias productoras de alimentos. En los últimos años, ha habido un cambio gradual en este sentido, enfocando los estudios en la complejidad que revisten las comunidades, junto con las interacciones entre miembros de la misma, modelando su desarrollo, estructura y función (Yang y col. 2011; Elias y Banin 2012; Rendueles y Ghigo 2012; Burmølle y col. 2014). En este escenario las bacterias estarían en desventaja en términos de competencia por el espacio, pero como se ha descrito para biofilms bacterianos en Liu y col. (2014), se podría suponer que la presencia de cepas de levadura buenas formadoras de biofilms promovería la colonización por patógenos de origen alimentario.

A pesar de que en las últimas décadas se reconoció la importancia del estudio de biofilms, en particular los mixtos, es relativamente poco lo que se sabe sobre el comportamiento de los microorganismos dentro de los mismos, donde estarían formando parte de una comunidad más que de una población.

Para intentar aclarar cómo se ve modificada la capacidad de adhesión y colonización de las superficies, en este caso AI, frente a una potencial interacción bacteria/levadura, se utilizaron dos levaduras reconocidas colonizadoras de industrias jugueras (*Candida krusei* y *Candida tropicalis*) y dos bacterias patógenas (*Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp.) implicadas en brotes asociados con jugos de fruta (FDA y col. 2001; Giaouris y col. 2015). El estudio de los cultivos mixtos reveló una relación de tipo antagonista con un resultado neto positivo para las bacterias en contraste con lo sucedido para las levaduras. Ambas bacterias mostraron una marcada preferencia a la adhesión a levaduras encontrándolas un sustrato biótico “amigable” para adherirse.

La habilidad de *Candida krusei* para tolerar un amplio rango de condiciones ambientales (bajos pHs, bajo a_w , presencia de preservantes y la tensión de oxígeno baja), la presencia de gran número de actividades metabólicas y una gran capacidad de adhesión y formación de biofilms en plantas productoras de alimentos, la hacen una especie de interés (Brugnoni y col. 2007; Srey y col. 2013).

Tanto por la capacidad de adhesión y colonización de *Candida tropicalis* (también aislada de las membranas de UF)⁵ como por el dimorfismo que presenta entre sus formas levaduriforme/ pseudohifa la hacen una especie de particular importancia en el estudio del desarrollo de biofilms. La capacidad de modificar su morfología se ha visto en otras cepas con desarrollo conocido de hifas y pseudohifas, lo cual es considerado una característica crucial para los estudios de adhesión y colonización de superficies (Saville y col. 2003; Calderone y Clancy 2011). En el caso de *Candida albicans*, (Sudbery 2011), encontraron que la morfogénesis levadura-hifa es mediada por el pH del medio que actúa como señal ambiental en la regulación de la expresión génica. Hecho que también fue reportado en otros estudios en donde la regulación de dos genes es dependiente sólo del pH y no de otros factores como la temperatura, factores nutricionales o morfológicos (Saporito-Irwin y col. 1995; Mühlshlegel y Fonzi 1997). Los ensayos realizados en jugo de manzana mostraron que *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7 se adhieren fácilmente al AI en periodos cortos de tiempo, lo cual resulta de interés para las industrias de jugos de frutas, especialmente si se consideran los períodos en donde no se está produciendo. Varios grupos de investigación han encontrado que apéndices extracelulares como los flagelos, fimbrias o curlis en bacterias pueden desempeñar un papel importante en las etapas iniciales de adhesión ayudando a las células en el paso primario de contacto célula-superficie (Austin y col. 1998; O'Toole y Kolter 1998; Pawar y col. 2005; Van Houdt y Michiels 2010).

Tanto la señalización célula-célula como el proceso de co-agregación son comúnmente abordados cuando se están estudiando interacciones entre microorganismos, con el fin de descifrar los factores que contribuyen a la competencia o cooperación entre ellos. La capacidad de co-agregarse podría ayudar a una especie bacteriana inhibiendo a otra, o darle protección frente a algún depredador. De acuerdo a lo descrito por Katharios-Lanwermeier y col. (2014) el proceso de co-agregación podría a su vez servirle a los microorganismos en el proceso de depredación, confiriendo beneficios sólo para uno de los microorganismos intervinientes resultando en una interacción negativa. Sumado a la co-agregación, otro factor de importancia en el proceso de colonización es la co-adhesión, que favorece el desarrollo, estabilización y mantenimiento de comunidades complejas (Jenkinson y Douglas 2002). En este sentido, la co-agregación puede ayudar mediante la unión

⁵ Ver Capítulo 1.

levadura/bacteria a formar acúmulos con aumentada velocidad de sedimentación, o también exponiendo los receptores de adhesión de la pared celular de la levadura (Peters y col. 2012).

Como *Candida tropicalis* y *Candida krusei* sobrevivieron los procesos de limpieza y desinfección realizados rutinariamente en la industria juguera de la cual se las obtuvo, se consideró que las mismas estaban firmemente adheridas a las membranas de UF; por lo tanto es inevitable que se encuentren e interactúen con otras especies que pueden estar formando parte de la comunidad o bien circulando por las cañerías/membranas a lo largo de los ciclos de producción. Estas interacciones pueden afectar la supervivencia, colonización y patogénesis de los microorganismos involucrados.

Los jugos se han convertido en vehículo para la transmisión de patógenos, tales como *Escherichia coli* O157, *Salmonella* y *Cryptosporidium* (Vantarakis y col. 2011). Entre los estudios que se realizaron se encontró que *Salmonella* sp. y *E. coli* O157: H7 son capaces de producir estructuras celulares que favorecen la co-agregación intra especie, así como con células de *C. krusei* y *C. tropicalis*. De esta forma se facilitaría la formación de comunidades de especies que, si lo hacen en superficies de contacto con alimentos, a través de la colonización y expansión pueden generar eventos de contaminación de los productos.

Las imágenes obtenidas por microscopía óptica revelaron interacción directa entre células de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. con ambas especies de levaduras en el proceso de co-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 dentro y entre especie (Giaouris y col. 2015) (Figuras 3.4, 3.11 y 3.13). También pueden darse interacciones de tipo químicas entre las especies intervinientes que induzcan cambios fenotípicos en ambas bacterias permitiéndoles una mejor adhesión.

Como ya se mencionó, *Candida tropicalis* en monocultivo forma biofilms densos con un alto número de hifas y pseudohifas, y cuando se la enfrentó a *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. se vio que las células bacterianas encontraban un nicho en las células de la levadura, prefiriendo la interacción con la misma que su adhesión a la superficie abiótica. Esta co-adhesión se trata de una interacción compleja multimodal mediante la cual se promueve la colonización por parte de múltiples especies. Se ha reportado (Newman y Wilson 1999; Jenkinson y Douglas 2002) que para estreptococos de origen bucal, actinomicetes y placa

bacteriana, muchas de las adhesinas que median la co-agregación son fimbrias o fibrillas. Estas estructuras penetran la barrera electrostática que opera entre las células próximas entre sí (10-20 nm de separación) (Busscher y col. 1992), actuando así como sondas para localizar con éxito el receptor apropiado en el microorganismo cercano.

Gran parte de los trabajos que se han realizado hasta el momento en lo que respecta a las interacciones hongo-bacteria fueron hechos desde el punto de vista clínico; de la revisión bibliográfica hecha, hasta la fecha no hay datos bibliográficos sobre los efectos de la interacción directa célula-célula entre especies de levaduras no-*Candida albicans* y patógenos transmitidos por alimentos. Debido a esto, la discusión comparativa de los resultados obtenidos se hará en referencia a levaduras y bacterias de importancia para la salud humana.

Dentro de un variado número de especies bacterianas se encontró que algunas presentaban preferencia por hifas de la especie *Candida albicans*, entre ellas *C. pyrogenes* y *Acinetobacter baumannii* (Cunningham 2000; Peleg y col. 2008; Bamford y col. 2009). Otra estrecha asociación entre células bacterianas e hifas se ha observado entre *C. albicans* y *Staphylococcus aureus*, la cual promovería la capacidad de *S. aureus* de invadir las capas epiteliales en una la interacción no letal (Thein y col. 2006; Peters y col. 2010).

Para evaluar la potencial interacción entre hifas y bacterias, Peters y col. (2010) utilizaron como sustrato biológico las hifas de *Candida albicans* y seis especies de bacterias diferentes. A partir de su estudio se demostró que *S. aureus* tenía la mayor asociación a hifas de *C. albicans* con un 56%, seguida por *S. pyrogenes* y *S. epidermidis* con el 25%. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, especie conocida por su capacidad aglutinante en presencia de hifas, tuvo una asociación de 17%, mientras que *E. coli* y *Bacillus subtilis*, demostraron una unión aún menor con 5,7 y 2,5%, respectivamente.

En nuestro estudio se observó una respuesta negativa en la interacción entre *Candida krusei* y *Candida tropicalis* y ambos patógenos transmitidos por alimentos (*E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp.). Nair y Samaranayake (1996a) demostraron que la adhesión de *Candida krusei* se veía afectada en presencia de una alta concentración de *E. coli* (10^5 y 10^6 células/ml). Una reducción significativa en los recuentos de *C. krusei* fue observada por Bandara y col. (2009) cuando fue co-cultivada con *E. coli* ATCC 25922, en comparación a los monocultivos.

Muchas de las interacciones previamente establecidas entre *Candida albicans* y bacterias resultan en la muerte del hongo y/o de la bacteria durante el co-cultivo (Hogan y col. 2004; Brand y col. 2008; Kim y Mylonakis 2011). Como se observó en las adhesiones mixtas (Figura 3.14) las células de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. interactúan estrechamente con las pseudohifas de *C. tropicalis*. La tinción con FDA, la cual es ampliamente utilizada como indicador de viabilidad celular, (Hassan y col. 2002; Rocha-Valadez y col. 2005; Lecault y col. 2007) nos permitió concluir que el efecto negativo de las bacterias sobre el desarrollo de biofilms por parte de las levaduras no se debió a la muerte de las estructuras hifales.

Uno de los primeros estudios realizados Nair y Samaranayake (1996a) encontró que *E. coli* suprimía significativamente la adhesión de *Candida albicans* y *Candida krusei* a células de la mucosa bucal (Nair y Samaranayake 1996b). Estudios más recientes del mismo grupo (Thein y col. 2006) confirmaron que *E. coli* y *P. aeruginosa* afectan significativamente la formación de biofilms por parte de *Candida albicans* pero de forma dosis dependiente. En el caso de Bandara y col. (2009) se observó que *E. coli* ATCC 25922 suprime la adhesión de otras especies del género *Candida*: *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Los autores postulan que *E. coli* y *Candida* en presencia de otras especies modulan la formación de biofilms tanto cuantitativa como cualitativamente, siendo el LPS de *E. coli* un componente clave en estos resultados. En un estudio más reciente Bandara y col. (2010) demostraron que el LPS producido por *Salmonella* disminuye significativamente la actividad metabólica de *Candida* spp.

Aunque los mecanismos exactos que subyacen en las interacciones entre hongos y bacterias no está dilucidado completamente, investigaciones recientes indican que una serie de moléculas secretadas por ambos tipos de especies estarían implicadas en la red de interacciones (McAlester y col. 2008; De Sordi y Mühlischlegel 2009). Tampakakis y col. (2009) demostraron que *S. typhimurium* pudo sintetizar y secretar una sustancia termoestable que inhibió la filamentación y formación biofilm de *Candida albicans* sobre silicona. En otro estudio se observó que *S. Typhimurium* se adhirió rápidamente a hifas de otros tipos de hongos como por ejemplo *Aspergillus niger*. Para que la interacción entre ambos se diera, fue primordial la interacción entre la celulosa producida por *S. Typhimurium* y la quitina de *A. niger* (Brandl y col. 2011). En el caso de *E. coli* O157: H7,

Uhlich y col. (2010) observaron interacciones de tipo célula-célula que promovían la retención de las bacterias en los biofilms, mientras que otros autores encontraron que cepas aisladas de ambientes relacionados al procesado de alimentos y agua estimulaban la co-adhesión y formación de biofilms por parte de *E. coli*. Por otro lado, Castonguay y col. (2006) demostraron que la formación de biofilms por parte de cepas no adherentes de *E. coli*, aislada de depósitos de agua potable, se estimulaba en presencia de biofilms duales con otras bacterias del mismo origen. Para que este estímulo se diera se necesitaba de un contacto célula-célula. Marouani-Gadri y col. (2009) encontró que 19 de 20 aislamientos al azar de bacterias en una planta procesadora de carne vacuna, luego de haber sido sometido a los procesos típicos de limpieza y desinfección, aumentaron los recuentos de *E. coli* O157:H7 en cultivos duales. Carter y col. (2012) examinó la interacción entre *E. coli* O157:H7 y los microorganismos presentes en hojas de espinaca, durante la colonización y establecimiento de biofilms mixtos sobre AI. Aunque los mecanismos detallados no se conocen con total claridad, es probable que el primer colonizador proporcione estructuras de superficie o componentes tensoactivos que promuevan la co-adhesión de *E. coli*.

Sólo unos pocos estudios se centran en sobrenadante de biofilms bacterianos y su efecto en la modulación de biofilms de *Candida* en cultivos mixto (Tampakakis y col. 2009; Holcombe y col. 2010). Por lo tanto, nuestro estudio se centró en la identificación del efecto de los productos extracelulares de *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* sp. sobre *C. krusei* y *Candida tropicalis* en lo que respecta a la adhesión y colonización, junto con la potencial implicancia del sobrenadante de *Candida* en el desempeño de ambas bacterias.

El comportamiento general de todas las especies intervinientes fue similar, encontrándose una reducción por parte de las especies de levaduras en la adhesión sobre AI cuando fueron expuestas a los sobrenadantes de ambas bacterias patógenas. El efecto negativo de los sobrenadantes de *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* sp. en la adhesión de *Candida krusei* y *C. tropicalis* sobre AI muestra una clara interacción negativa a través de la presencia de moléculas o de cambios en el medio que afectan significativamente la adhesión de las levaduras. Similarmente, Bandara y col. (2013) observaron que un compuesto activo secretado por *E. coli* afectó el tamaño y la forma de *C. krusei* en la fase inicial de colonización (90 minutos a 24 horas). El mismo grupo observó un retraso en el crecimiento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* en la fase inicial de colonización en

presencia del sobrenadante de *E. coli*, pero aún más importante en la etapa de maduración después de 24 horas. Park y col. (2014) afirmaron que el efecto inhibitorio de las bacterias podía ser inducido por un metabolito sintetizado durante la fase de la multiplicación y crecimiento, y / o por una expresión génica diferencial en respuesta a los co-cultivos.

Por el contrario, estos efectos no fueron observados cuando se enfrentaron los cultivos de las bacterias a los sobrenadantes de las levaduras lo que sugiere que bajo las condiciones ensayadas las bacterias se benefician del contacto célula-célula en lugar de la presencia de alguna molécula secretada.

Evidentemente bacterias patógenas como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp. junto con levaduras deteriorantes como *Candida tropicalis* y *Candida krusei* pueden estar contenidas en comunidades las cuales pueden formarse en equipos de producción inadecuadamente limpiados y desinfectados. Los hallazgos de estos estudios apoyan la factibilidad de que patógenos interactúen con miembros de la microbiota indígenas de las planta productoras de jugo de manzana (*Candida tropicalis* y *Candida krusei*) desempeñando un papel importante para la supervivencia y propagación de *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* sp. en entornos de procesamiento de alimentos.

Es evidente que eucariotas y procariotas presentan diversos mecanismos de señalización para detectar y responder en función de otros. Los resultados anteriores sugieren que la interacción de la comunidad microbiana indígena con patógenos puede aumentar o reducir la capacidad de adhesión y colonización de superficies en instalaciones productoras/procesadoras de jugo, lo que potencialmente puede contribuir a eventos de contaminación cruzada. Esto es de gran relevancia ya que pone de manifiesto que el control de microorganismos ambientales que promueven la adhesión de bacterias transmitidas por alimentos puede ser una medida importante para prevenir el establecimiento de cepas patógenas como *E. coli* y *Salmonella* sp. en ambientes de procesamiento de alimentos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asplund, K. y Nurmi, E. (1991). "The growth of salmonellae in tomatoes." *International Journal of Food Microbiology* **13**(2): 177-181.
- Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W. y Collinson, S. K. (1998). "Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation." *FEMS Microbiology Letters* **162**(2): 295-301.
- Baillie, G. S. y Douglas, L. J. (1999). "Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms." *Journal of Medical Microbiology* **48**(7): 671-679.
- Bamford, C. V., D'Mello, A., Nobbs, A. H., Dutton, L. C., Vickerman, M. M. y Jenkinson, H. F. (2009). "*Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication." *Infection and Immunity* **77**(9): 3696-3704.
- Bandara, H., Cheung, B. P., Watt, R. M., Jin, L. J. y Samaranayake, L. P. (2013). "Secretory products of *Escherichia coli* biofilm modulate *Candida* biofilm formation and hyphal development." *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* **4**(3): 186-199.
- Bandara, H., Yau, J., Watt, R., Jin, L. y Samaranayake, L. (2009). "*Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate in vitro *Candida* biofilm formation." *Journal of Medical Microbiology* **58**(12): 1623-1631.
- Bandara, H., Yau, J., Watt, R., Jin, L. y Samaranayake, L. (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development." *BMC Microbiology* **10**(1): 1.
- Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, J. T., Doyle, M. P., Barrett, T. J., Wells, J. G. y Griffin, P. M. (1993). "An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider." *Jama* **269**(17): 2217-2220.
- Brand, A., Barnes, J. D., Mackenzie, K. S., Odds, F. C. y Gow, N. A. (2008). "Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiology Letters* **287**(1): 48-55.
- Brandl, M. T., Carter, M. Q., Parker, C. T., Chapman, M. R., Huynh, S. y Zhou, Y. (2011). "*Salmonella* biofilm formation on *Aspergillus niger* involves cellulose-chitin interactions." *PLoS One* **6**(10): e25553.
- Brooks, J. D. y Flint, S. H. (2008). "Biofilms in the food industry: problems and potential solutions." *International Journal of Food Science & Technology* **43**(12): 2163-2176.
- Brown, M. y Booth, I. (1991). "Acidulants and low pH." *Food Preservatives* **3**: 22-43.
- Brugnoni, L., Lozano, J. y Cubitto, M. (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.

Brugnoni, L. I., Cubitto, M. A. y Lozano, J. E. (2012a). "Candida krusei development on turbulent flow regimes: Biofilm formation and efficiency of cleaning and disinfection program." *Journal of Food Engineering* **111**(4): 546-552.

Brugnoni, L. I., Lozano, J. E. y Cubitto, M. A. (2012b). "Efficacy of sodium hypochlorite and quaternary ammonium compounds on yeasts isolated from apple juice." *Journal of Food Process Engineering* **35**(1): 104-119.

Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T. y Sørensen, S. J. (2014). "Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?" *Trends in Microbiology* **22**(2): 84-91.

Busscher, H., Cowan, M. y Van der Mei, H. (1992). "On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion." *FEMS Microbiology Reviews* **8**(3-4): 199-209.

Calderone, R. A. y Clancy, C. J. (2011). *Candida and candidiasis*. Washington DC, EE.UU., American Society for Microbiology Press, 472 p.

Carter, M. Q., Xue, K., Brandl, M. T., Liu, F., Wu, L., Louie, J. W., Mandrell, R. E. y Zhou, J. (2012). "Functional metagenomics of *Escherichia coli* O157: H7 interactions with spinach indigenous microorganisms during biofilm formation." *PLoS One* **7**(9): e44186.

Castonguay, M.-H., Van der Schaaf, S., Koester, W., Krooneman, J., Van der Meer, W., Harmsen, H. y Landini, P. (2006). "Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria." *Research in Microbiology* **157**(5): 471-478.

Collado, M. C., Meriluoto, J. y Salminen, S. (2008). "Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains." *European Food Research and Technology* **226**(5): 1065-1073.

Cowan, S. E., Gilbert, E., Liepmann, D. y Keasling, J. (2000). "Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds." *Applied and Environmental Microbiology* **66**(10): 4481-4485.

Cunningham, M. W. (2000). "Pathogenesis of group A streptococcal infections." *Clinical microbiology reviews* **13**(3): 470-511.

Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T. y Ghannoum, M. A. (2001). "Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance." *Journal of Bacteriology* **183**(18): 5385-5394.

Cheng, H.-Y., Yu, R.-C. y 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.

Chmielewski, R. y Frank, J. (2003). "Biofilm formation and control in food processing facilities." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2**(1): 22-32.

- Chorianopoulos, N., Giaouris, E., Skandamis, P., Haroutounian, S. y Nychas, G. J. (2008). "Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers." *Journal of Applied Microbiology* **104**(6): 1586-1596.
- De Sordi, L. y 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.
- El-Azizi, M., Starks, S. y Khardori, N. (2004). "Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms." *Journal of Applied Microbiology* **96**(5): 1067-1073.
- Elias, S. y Banin, E. (2012). "Multi-species biofilms: living with friendly neighbors." *FEMS Microbiology Reviews* **36**(5): 990-1004.
- Else, T. A., Pantle, C. R. y Amy, P. S. (2003). "Boundaries for biofilm formation: humidity and temperature." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(8): 5006-5010.
- FDA, U., Food y Administration, D. (2001). "Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice." *Federal Register* **66**: 13-19.
- Fleet, G. H., Doyle, M. y Beuchat, L. (2007). Wine. Food microbiology: Fundamentals and frontiers. Washington DC, EE.UU., ASM Press: 863-890.
- Flemming, H.-C. y Ridgway, H. (2008). Biofilm control: conventional and alternative approaches. Marine and Industrial Biofouling. Berlín, Alemania, Springer Berlin Heidelberg: 103-117.
- Foster, J. W. (1991). "*Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response." *Journal of Bacteriology* **173**(21): 6896-6902.
- Foster, J. W. y Hall, H. K. (1991). "Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*." *Journal of Bacteriology* **173**(16): 5129-5135.
- Furukawa, S., Nojima, N., Yoshida, K., Hirayama, S., Ogihara, H. y Morinaga, Y. (2011). "The importance of inter-species cell-cell co-aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in mixed-species biofilm formation." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **75**(8): 1430-1434.
- Fux, C., Costerton, J., Stewart, P. y Stoodley, P. (2005). "Survival strategies of infectious biofilms." *Trends in Microbiology* **13**(1): 34-40.
- Gabriel, A. 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.

Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., y col. (2015). "Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens." *Frontiers in Microbiology* **6**(1): 26.

Golden, D. A., Rhodehamel, E. J. y Kautter, D. A. (1993). "Growth of *Salmonella* spp. in cantaloupe, watermelon, and honeydew melons." *Journal of Food Protection*® **56**(3): 194-196.

Guillier, L., Stahl, V., Hezard, B., Notz, E. y Briandet, R. (2008). "Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves." *International Journal of Food Microbiology* **128**(1): 51-57.

Harvey, J., Keenan, K. y Gilmour, A. (2007). "Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains." *Food Microbiology* **24**(4): 380-392.

Hassan, M., Corkidi, G., Galindo, E., Flores, C. y Serrano-Carreón, L. (2002). "Accurate and rapid viability assessment of *Trichoderma harzianum* using fluorescence-based digital image analysis." *Biotechnology and Bioengineering* **80**(6): 677-684.

Hawser, S. P. y Douglas, L. J. (1994). "Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro." *Infection and Immunity* **62**(3): 915-921.

Hogan, D. A. (2006). "Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi." *Eukaryotic Cell* **5**(4): 613-619.

Hogan, D. A., Vik, Å. y Kolter, R. (2004). "A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology." *Molecular Microbiology* **54**(5): 1212-1223.

Holcombe, L. J., McAlester, G., Munro, C. A., Enjalbert, B., Brown, A. J., Gow, N. A., y col. (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* secreted factors impair biofilm development in *Candida albicans*." *Microbiology* **156**(5): 1476-1486.

Ica, T., Caner, V., Istanbulu, O., Nguyen, H. D., Ahmed, B., Call, D. R. y Beyenal, H. (2012). "Characterization of mono-and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms." *Applied and Environmental Microbiology* **78**(4): 1033-1038.

Jahid, I. K. y Ha, S. D. (2014). "The paradox of mixed-species biofilms in the context of food safety." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**(5): 990-1011.

Jain, N., Kohli, R., Cook, E., Gialanella, P., Chang, T. y Fries, B. (2007). "Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(6): 1697-1703.

Jenkinson, H. F. y Douglas, L. J. (2002). Interactions between *Candida* species and bacteria in mixed infections. *Polymicrobial Diseases*. Washington DC, EE.UU., ASM Press: 357-373.

Katharios-Lanwermyer, S., Xi, C., Jakubovics, N. y Rickard, A. (2014). "Mini-review: microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development." *Biofouling* **30**(10): 1235-1251.

Kay, M. K., Erwin, T. C., McLean, R. J. y Aron, G. M. (2011). "Bacteriophage ecology in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* mixed-biofilm communities." *Applied and Environmental Microbiology* **77**(3): 821-829.

Kim, Y. 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): 782-790.

Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.-J. y Giaouris, E. (2012). "Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions." *Applied and Environmental Microbiology* **78**(8): 2586-2595.

Kraigsley, A., Ronney, P. D. y Finkel, S. E. (2002). "Dynamics of self-propagating fronts of motile bacteria." *Disponibile desde internet en:* <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/BacterialFronts.html>.

Kuhn, D., Chandra, J., Mukherjee, P. y Ghannoum, M. (2002). "Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces." *Infection and Immunity* **70**(2): 878-888.

Kumar, C. G. y Anand, S. (1998). "Significance of microbial biofilms in food industry: a review." *International Journal of Food Microbiology* **42**(1): 9-27.

Lebert, I., Leroy, S. y Talon, R. (2007). "Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm." *Food Microbiology* **24**(3): 281-287.

Lecault, V., Patel, N. y Thibault, J. (2007). "Morphological characterization and viability assessment of *Trichoderma reesei* by image analysis." *Biotechnology Progress* **23**(3): 734-740.

Leyer, G. J. y Johnson, E. A. (1997). "Acid adaptation sensitizes *Salmonella typhimurium* to hypochlorous acid." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(2): 461-467.

Liu, N. T., Nou, X., Lefcourt, A. M., Shelton, D. R. y 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.

Malik, A., Sakamoto, M., Ono, T. y 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.

Mao, Y., Doyle, M. P. y Chen, J. (2001). "Insertion mutagenesis of wca reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7." *Journal of Bacteriology* **183**(12): 3811-3815.

Marouani-Gadri, N., Augier, G. y Carpentier, B. (2009). "Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection—Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157: H7." *International Journal of Food Microbiology* **133**(1): 62-67.

McAlester, G., O'Gara, F. y Morrissey, J. P. (2008). "Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*." *Journal of Medical Microbiology* **57**(5): 563-569.

Morgan, D., Newman, C., Hutchinson, D., Walker, A., Rowe, B. y Majid, F. (1993). "Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt." *Epidemiology and Infection* **2**(111): 181-187.

Mühlschlegel, F. y Fonzi, W. A. (1997). "PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression." *Molecular and Cellular Biology* **17**(10): 5960-5967.

Nair, R. y Samaranayake, L. (1996a). "The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to human buccal epithelial cells in vitro." *Journal of Medical Microbiology* **45**(3): 179-185.

Nair, R. G. y Samaranayake, L. P. (1996b). "The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces." *Apmis* **104**(1-6): 339-349.

Newman, N. y Wilson, M. (1999). "Dental plaque revisited. Oral biofilms in health and disease." *Caries Research* **33**: 170.

Nikolaev, Y. A. y Plakunov, V. (2007). "Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms?" *Microbiology* **76**(2): 125-138.

O'Brien, S., Lindsay, D. y Von Holy, A. (2007). "Biofilms associated with the final stages of Baker's compressed yeast production." *British Food Journal* **109**(1): 20-30.

O'Toole, G. A. y Kolter, R. (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." *Molecular microbiology* **30**(2): 295-304.

Parahitiyawa, N., Samaranayake, Y., Samaranayake, L., Ye, J., Tsang, P., Cheung, B., Yau, J. y Yeung, S. (2006). "Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device." *Apmis* **114**(4): 298-306.

Parish, M. (1997). "Public health and nonpasteurized fruit juices." *Critical Reviews in Microbiology* **23**(2): 109-119.

Park, S. J., Han, K.-H., Park, J. Y., Choi, S. J. y Lee, K.-H. (2014). "Influence of bacterial presence on biofilm formation of *Candida albicans*." *Yonsei Medical Journal* **55**(2): 449-458.

Pawar, D., Rossman, M. y Chen, J. (2005). "Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces." *Journal of Applied Microbiology* **99**(2): 418-425.

- Peleg, A. Y., Tampakakis, E., Fuchs, B. B., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C. y Mylonakis, E. (2008). "Prokaryote–eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(38): 14585-14590.
- Percival, S. L., Walker, J. T. y Hunter, P. R. (2000). Microbiological aspects of biofilms and drinking water. Nueva York, EE.UU., CRC Press, 240 p.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M. y Zurera, G. (2008). "Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review." *Trends in Food Science & Technology* **19**(3): 131-144.
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Graeme, A., Costerton, J. W. y Shirtliff, M. E. (2012). "Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease." *Clinical Microbiology Reviews* **25**(1): 193-213.
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J. W. y Shirtliff, M. E. (2010). "Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* dual-species biofilms." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **59**(3): 493-503.
- Ramage, G., VandeWalle, K., Bachmann, S. P., Wickes, B. L. y López-Ribot, J. L. (2002). "In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**(11): 3634-3636.
- Rendueles, O. y Ghigo, J.-M. (2012). "Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors." *FEMS Microbiology Reviews* **36**(5): 972-989.
- Rocha-Valadez, J. A., Hassan, M., Corkidi, G., Flores, C., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. (2005). "6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum*: The influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology." *Biotechnology and Bioengineering* **91**(1): 54-61.
- Salo, S. y Wirtanen, G. (2005). "Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains." *Food and Bioprocess Technology* **83**(4): 288-296.
- Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. y Fonzi, W. A. (1995). "PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis." *Molecular and Cellular Biology* **15**(2): 601-613.
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C. y Lopez-Ribot, J. L. (2003). "Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection." *Eukaryotic Cell* **2**(5): 1053-1060.
- Shikongo-Nambabi, M. N. N. N., Shoolongela, A. y Schneider, M. (2011). "Control of bacterial contamination during marine fish processing." *Journal of Biology and Life Science* **3**(1).

- Shirtliff, M. E., Peters, B. M. y Jabra-Rizk, M. A. (2009). "Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria." *FEMS Microbiology letters* **299**(1): 1-8.
- Srey, S., Jahid, I. K. y Ha, S.-D. (2013). "Biofilm formation in food industries: a food safety concern." *Food Control* **31**(2): 572-585.
- Stratford, M., Hofman, P. y Cole, M. (2000). "Fruit juices, fruit drinks, and soft drinks." *The Microbiological Safety and Quality of Food* **1**: 836-869.
- Sudbery, P. E. (2011). "Growth of *Candida albicans* hyphae." *Nature Reviews Microbiology* **9**(10): 737-748.
- Sutherland, I. W. (2001). "The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment." *Trends in Microbiology* **9**(5): 222-227.
- Tampakakis, E., Peleg, A. Y. y Mylonakis, E. (2009). "Interaction of *Candida albicans* with an intestinal pathogen, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Eukaryotic Cell* **8**(5): 732-737.
- Ten Cate, J., Klis, F., Pereira-Cenci, T., Crielaard, W. y De Groot, P. (2009). "Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation." *Journal of Dental Research* **88**(2): 105-115.
- Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H. y Samaranayake, L. P. (2006). "Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms." *Archives of Oral Biology* **51**(8): 672-680.
- Tsai, Y.-W. y Ingham, S. C. (1997). "Survival of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments." *Journal of Food Protection*® **60**(7): 751-755.
- Uhlich, G. A., Rogers, D. P. y Mosier, D. A. (2010). "*Escherichia coli* serotype O157: H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation." *Foodborne Pathogens and Disease* **7**(8): 935-943.
- Van Houdt, R. y Michiels, C. W. (2010). "Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface." *Journal of applied microbiology* **109**(4): 1117-1131.
- Vantarakis, A., Affifi, M., Kokkinos, P., Tsibouxi, M. y Papapetropoulou, M. (2011). "Occurrence of microorganisms of public health and spoilage significance in fruit juices sold in retail markets in Greece." *Anaerobe* **17**(6): 288-291.
- Weagant, S. D., Bryant, J. L. y Bark, D. H. (1994). "Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures." *Journal of Food Protection*® **57**(7): 629-631.
- Whitehead, K. A., Colligon, J. y Verran, J. (2005). "Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **41**(2): 129-138.

Williams, P. (2007). "Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world." *Microbiology* **153**(12): 3923-3938.

Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Høiby, N., Molin, S. y Song, Z.-j. (2011). "Current understanding of multi-species biofilms." *International Journal of Oral Science* **3**(2): 74.

Zhuang, R., Beuchat, L. y Angulo, F. (1995). "Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(6): 2127-2131.

CAPÍTULO 3

FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE MEMBRANAS DE ULTRAFILTRACIÓN - ESTRATEGIAS DE CONTROL

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años los procesos de filtración por membrana han sido la principal elección de las industrias procesadoras de alimentos (Mohammad y col. 2012). En comparación con los métodos convencionales de concentración (ej. procesos térmicos) y de separación (ej. decantación, filtración) la utilización de membranas de filtración aporta competitivamente tres grandes beneficios (Daufin y col. 2001; Lim y Mohammad 2011):

- Mayor calidad de los alimentos.
- Mayor competitividad desde un punto de vista económico – costos operativos más bajos
- Son consideradas tecnologías limpias – “amigables” con el ambiente

Hay cuatro clases de procesos en los cuales el medio filtrante es una membrana y se diferencian por el tamaño de partículas que separan: Microfiltración (MF), Ultrafiltración (UF), Nanofiltración (NF) y Ósmosis inversa (OI) (Lipnizki 2010) (Figura 1.1). La microfiltración es la remoción de partículas micrométricas o submicrométricas de una solución, generalmente recuperando el 100 % del material. La UF y la NF pueden separar partículas entre 10^6 Å, dentro de este rango se encuentran las proteínas, pectinas, almidones, bacterias y virus, sólidos coloidales, pigmentos, etc. Y por último la ósmosis inversa, que es una separación más "fina" que la ultrafiltración y separa partículas de diámetro comprendido entre 2 y 10 Å (por ejemplo sales).

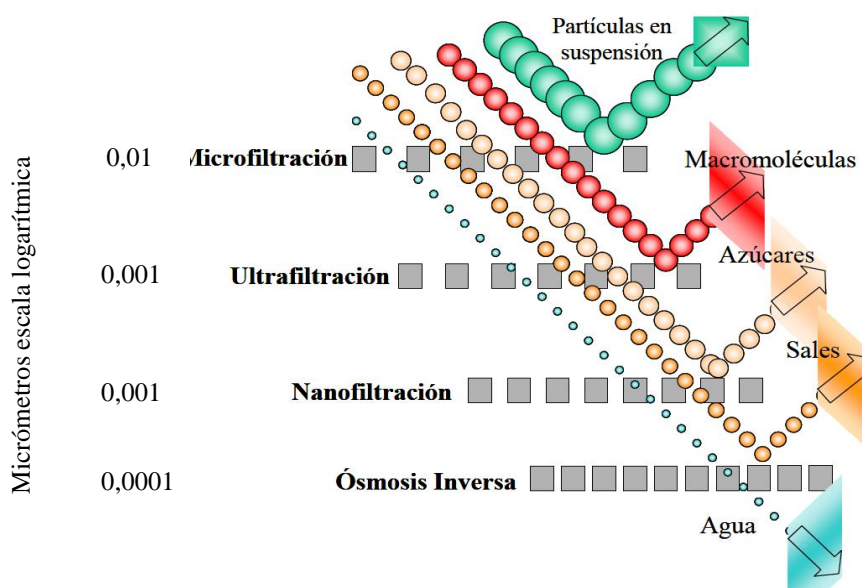


Figura 1.1. Tamaño promedio de poro de acuerdo a las membranas utilizadas en diferentes procesos. Modificado de Lalia y col. (2013).

La UF y la NF son las más utilizadas en la industria de los alimentos en general y en la clarificación de jugos de fruta en particular (Cheryan 1986), usándose sistemas de filtración tangencial donde la fuerza impulsora proviene de la diferencia de presión, resultando así en la separación y/o concentración de las partículas disueltas o suspendidas (Figura 1.2). La UF conjuntamente con la NF y la OI, constituyen el primer proceso de separación molecular continua que no implica un cambio de fase o una interfase de transferencia de masa, aplicable a la separación de soluciones de macromoléculas. Mediante esta técnica se realiza una purificación y concentración simultánea junto con el fraccionamiento de macromoléculas de pequeñas suspensiones coloidales (Fellows y Javier 1993).

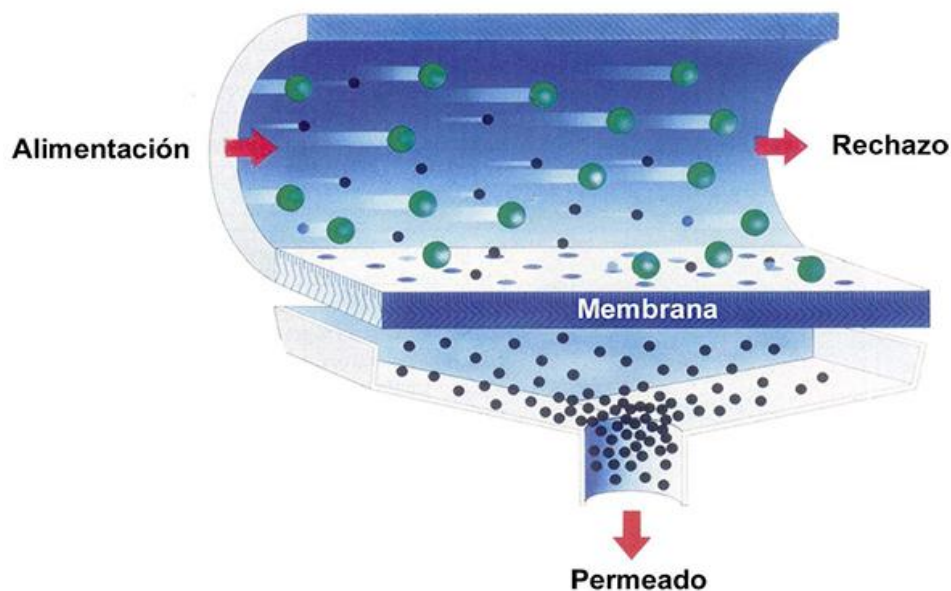


Figura 1.2. Esquema del proceso de filtración por membrana de tipo tangencial.

El procesado de alimentos a través de la utilización de membranas se ha convertido en una herramienta estándar en las industrias productoras (Cheryan 1998). La clarificación del jugo de manzana (además de otras variedades de frutas y verduras) mediante sistemas de membrana ha ido en aumento a partir de sus primeros usos a finales de los años 70 (Heatherbell y col. 1977; Echavarría y col. 2011). A través de la clarificación del jugo se separa la pulpa fibrosa (retenido) de la fracción clarificada libre de microorganismos (permeado) (Cassano y col. 2008), con lo cual el jugo clarificado puede ser luego sometido a una etapa de concentración para su posterior envasado y almacenaje.

En cuanto a las membranas de UF, que son las más utilizadas en la clarificación de jugos, se pueden clasificar según el material con que se fabrican, en primera generación (acetato de celulosa), segunda generación (polisulfonas) y tercera generación (membranas minerales). Además, presentan cuatro configuraciones básicas: tubulares, planas, espirales y fibras huecas (Constenla y Lozano 1997; Wagner 2001).

La filtración por membranas se caracteriza por operar con flujo a lo largo de la misma, lo que ayuda a remover la capa de macromoléculas retenidas sobre ella. El material que atraviesa la membrana se denomina entonces "permeado" y la velocidad a la cual fluye a través de la misma es el flujo de permeado (J) medido en unidades de velocidad por área de membrana. El caudal de jugo "retenido", que circula dentro del equipo se denomina caudal de recirculación (Q_r).

Dentro de las opciones viables a escala industrial en cuanto a los procesos de filtración están los procesos de filtración "tangencial" o "*cross-flow filtration*". Mediante este tipo de filtración, el líquido fluye paralelamente a la superficie de la membrana, lo que provoca que el mismo alimento líquido barra continuamente la superficie del medio filtrante (Lozano 2006). La selectividad de una membrana de UF se cuantifica a través de la curva de corte molecular o "*cut-off*". Es importante indicar que en una solución con especies de diferentes pesos moleculares, se deberá cuantificar el rechazo para cada especie en particular. Los fabricantes utilizan el concepto de "*cut-off*" (MWCO) para caracterizar sus membranas de UF. El *cut-off* es definido como aquel peso molecular que es rechazado por la membrana en un 90%. Por ejemplo, una membrana de *cut-off* igual a 40.000 rechazará en un 90% a los solutos cuyo peso molecular sea mayor que 40.000 Daltons.

Desafortunadamente, el ensuciamiento de la membrana causado por la deposición de macromoléculas, coloides, partículas en suspensión o de material de tipo biológico, *biofouling*, sobre la superficie o en los poros de la misma limita su aplicación en la industria de procesado de alimentos (Mohammad y col. 2012).

Dentro del *fouling* que sufren las membranas, la formación de biofilms es uno de los fenómenos de ensuciamiento más complejos ya que causa pérdidas severas en el rendimiento de las mismas, modifica sus propiedades de superficie y demanda la implementación de costosos programas de limpieza o directamente su reemplazo. El proceso de *biofouling* sobre las membranas de filtración lleva a un aumento de la presión transmembrana bajo flujo constante o a una disminución del flujo de permeado si operan bajo presión constante (Fortunato y col. 2017).

Si la solución filtrada está compuesta por hidrocoloides u otras macromoléculas que sean retenidas por la membrana, se produce el fenómeno de "polarización de la concentración", ya que éstos tienden a formar sobre la membrana capas gelatinosas, que presentan una resistencia adicional al flujo. Se observa que el caudal de permeado aumenta a medida que lo hace la turbulencia, es decir, cuando se incrementa el caudal de recirculación y baja la concentración. Esto podría explicarse por la reducción del espesor de la capa límite. Por otro lado, el desarrollo de biofilms microbianos, favorecidos por la presencia de la capa de polarización, contribuye también con una significativa reducción del flujo de permeado y un deterioro general de la performance de la membrana (Ridgway y col. 1983; Di Martino y col. 2007; Doumèche y col. 2007). Los depósitos de suciedad sobre las membranas son el resultado tanto de la formación de biofilms como de los residuos no eliminados, con lo cual la limpieza industrial de las unidades de UF y NF aumenta esta heterogeneidad (Di Martino y col. 2007) dificultando su limpieza. En el contexto de la UF y la NF, los biofilms formados no pueden ser removidos en forma completa por retrolavados. Esto implica que deben utilizarse métodos químicos de limpieza (Vrouwenvelder y Van der Kooij 2001; Liikanen y col. 2002). Estos métodos recuperan por lo general las propiedades hidráulicas de las membranas pero tienen poco impacto en la composición y organización del depósito (exopolisacáridos de la matriz del biofilm). La acumulación irreversible de biofilms sobre la membrana, junto con la reiterada deposición de material a lo largo de los ciclos de producción, puede resultar en la inutilización de la misma llevando a su reemplazo. En los sistemas de filtración, el crecimiento del biofilm crea una película que atrapa sales y otros nutrientes previniendo que el flujo turbulento mezcle totalmente los solutos en la corriente de alimentación. Además de servir como estructuras para estabilizar las colonias, los biofilms protegen a los microorganismos de los desinfectantes, de ser eliminados por el líquido en movimiento y favorecen la captura de alimento de la corriente. Es reconocido que las células incluidas en un biofilm son más resistentes a los desinfectantes químicos que sus formas planctónicas (Donlan y Costerton 2002; Stewart 2015) y la complejidad aumenta si consideramos que los biofilms multi-especie presentan una marcada resistencia a los biocidas comúnmente utilizados en ambientes industriales y en salud humana (Simões y col. 2010).

El proceso de adhesión implica complejas interacciones entre los microorganismos y el sustrato al cual se van a adherir lo cual es influenciado por el entorno (Mizan y col.

2015). Las características de las interacciones entre las membranas y los microorganismos que se desarrollan sobre las mismas no están del todo dilucidadas, lo cual es esencial para evaluar condiciones operacionales sostenibles y para establecer estrategias apropiadas para la reducción y eliminación de los biofilms (Fortunato y col. 2017). Procesos inadecuados de limpieza y desinfección de las superficies en contacto con alimentos contribuyen a la mayoría de los episodios de enfermedades transmitidas por los mismos (Mathusa y col. 2010; Fouladkhah y col. 2013). Tanto el diseño apropiado de los protocolos de limpieza y desinfección como de los equipos y los procesos son importantes para prevenir la formación de biofilms en las superficies (Lelieveld 2005; Lelieveld y col. 2014).

Diferentes agentes biocidas se utilizan en los programas de limpieza y desinfección como estrategias para controlar a microorganismos patógenos y deteriorantes (Evans 2003). El hipoclorito de sodio, a pesar de ser corrosivo a altas concentraciones, es uno de los desinfectantes más utilizados en la industria debido a su bajo costo y alta efectividad microbicida (Borovec y col. 1998; Dodds y col. 2000).

Es por lo anterior que en este capítulo se plantearon objetivos tendientes a evaluar la eficacia del hipoclorito de sodio mediante ensayos con células tanto adheridas como planctónicas, formando parte de cultivos mono y multi-especie.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la dinámica de adhesión y formación de biofilms sobre membranas de ultrafiltración y la eficacia del hipoclorito de sodio como agente desinfectante.

Objetivos específicos

- Estudiar la dinámica de adhesión y formación de biofilms de *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* y *Rhodotorula mucilaginosa* sobre membranas de ultrafiltración bajo condiciones de relevancia industrial.
- Diseñar estrategias de control mediante secuencias de limpieza y desinfección en condiciones de flujo variable sobre el cultivo de microorganismos en forma planctónica y formando parte de un biofilm.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ensayos de desinfección sobre células planctónicas

La realización de pruebas estandarizadas para determinar la acción de un agente antimicrobiano contra microorganismos específicos es importante por el amplio rango de resistencia presente entre especies. A fin de evaluar en forma preliminar la eficacia de un desinfectante y establecer una concentración efectiva, segura y económica del mismo, se realizaron ensayos en suspensión con células en desarrollo planctónico, de acuerdo a protocolos estandarizados.

Para los ensayos de desinfección sobre células en estado planctónico se utilizaron soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) preparadas a partir una solución de origen comercial (60 g Cl/litro, Clorox S.R.L., Argentina). Las determinaciones del Cl activo se realizaron a través del método Iodométrico de VOGEL (APHA-AWWA/WEF 2005), a partir del cual se realizaron los cálculos correspondientes para las distintas concentraciones utilizadas. Las soluciones de NaClO se prepararon con agua destilada estéril las cuales presentaron los siguientes pHs: 6,5, 8 y 9 (0,05- 0,15- 0,20 g Cl/litro, respectivamente).

Para cada una de las cuatro especies de levaduras se preparó una suspensión ajustada en jugo de manzana estéril de 12 °Brix hasta alcanzar una DO_{550} de 0,125 ($\approx 10^6$ células/ml). Para los ensayos se mezclaron 2 ml de la suspensión ajustada con 18 ml de las soluciones de desinfectante tomándose muestras al cabo de 5, 10, 15 y 30 minutos. Para esto 1 ml de muestra fue diluida en una primer dilución con 9 ml de buffer fosfato con 0,2 % de tiosulfato (Stewart y col. 2001) y agitado durante 15 segundos. Los recuentos se realizaron en agar YGC por técnica de agar volcado incubándose a 25 ± 1 °C durante 5 días.

Un segundo ensayo consistió en evaluar la resistencia de suspensiones mixtas de las especies de levaduras ante concentraciones crecientes de Cl. El procedimiento fue el mismo que el mencionado previamente pero con ciertas modificaciones: (i) los 2 ml consistieron en partes iguales de suspensiones ajustadas de *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* y *R. mucilaginosa* y (ii) se evaluó una concentración mayor de Cl (1 g/litro, pH 10).

2.2 Ensayos de desinfección sobre células adheridas

Luego de realizar los ensayos con células planctónicas se procedió a analizar la eficiencia del agente desinfectante frente a células adheridas siguiendo el protocolo mostrado en la

Figura 2.1. Para esto se ensayaron dos superficies: membranas de UF de PVDF y superficies de acero inoxidable.

Los segmentos de AI utilizados fueron de tipo AISI 304 L de 1 cm x 2 cm; previo a su utilización fueron acondicionadas a través de lavados con una solución de detergente neutro al 2% (Extran MA 02 neutal, Merck) y enjuagada con agua destilada a 50 °C, para ser autoclavados durante 15 min a 121 °C. En el caso de las membranas fueron de las mismas características que las detalladas posteriormente en la Sección 2.3.

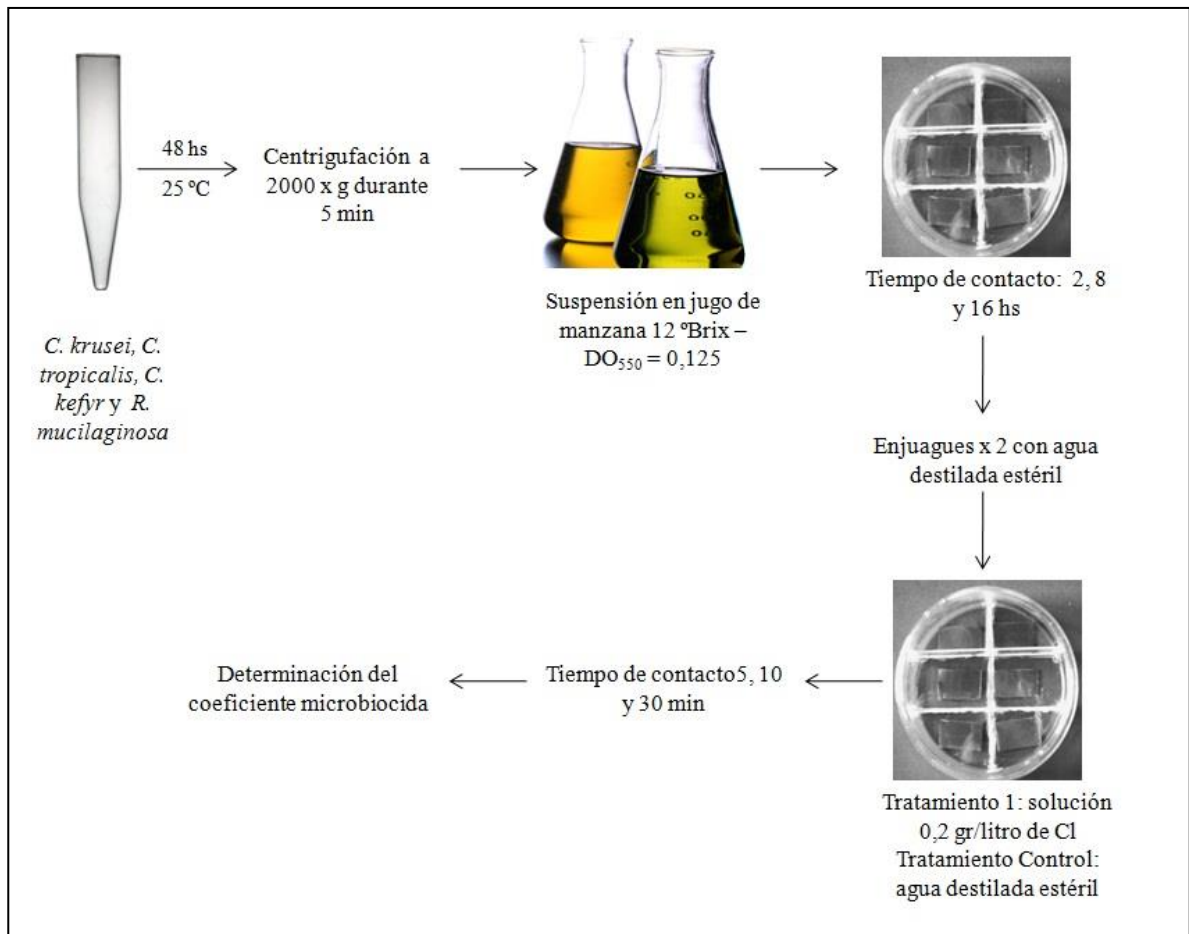


Figura 2.1. Representación esquemática del protocolo de desinfección sobre células adheridas

Los ensayos consistieron en la desinfección con una solución de NaClO de 0,20 g/l de Cl, siguiendo las concentraciones de uso rutinario en la empresa juguera de la cual se obtuvieron originalmente las muestras y en función de los resultados obtenidos en los ensayos con células planctónicas. Luego se destinaron también segmentos como control, en donde los mismos fueron puestos en contacto con agua destilada estéril. Al cabo de cada tiempo (5, 10 y 30 min) se destinaron segmentos de AI y membranas de UF para su análisis por microscopia de epifluorescencia, mientras que los recuentos de células

viables se realizaron colocando los segmentos en tubos de ensayo con perlas de vidrio agitándolos a máxima velocidad durante 3 minutos con vórtex. Las correspondientes diluciones seriadas se utilizaron para realizar los recuentos en agar YGC por técnica de agar volcado y las placas fueron incubadas a 25 ± 1 °C durante 5 días. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados de las experiencias fueron expresados como Efecto Microbicida (EM) de acuerdo a lo expuesto en Salo y Wirtanen (2005):

$$EM = \text{Log}N_o - \text{Log}N_i$$

En donde N_o corresponde al número inicial de células/cm² (control) y N_i corresponde al número de células/cm² sobrevivientes. En el caso de ensayos con células planctónicas las determinaciones se expresaron como número de células/ml.

2.3 Ensayos de desinfección sobre células adheridas a membranas de UF en condiciones de flujo variable

Teniendo en cuenta que las plantas productoras de jugos de frutas se ven comprometidas por la colonización de levaduras, y que la adhesión depende, entre otros factores, de la superficie y de las condiciones hidrodinámicas del sistema, se realizaron ensayos de adhesión sobre membranas de UF. Para esto se usó una celda de flujo que simula el proceso de UF a fin de evaluar la eficacia del hipoclorito de sodio sobre las células adheridas.

Para llevar a cabo los ensayos se utilizó una unidad de filtración por membrana a escala laboratorio de flujo transversal (Sepa CF System, Osmonics, Minnetonka, MN, EE.UU) la cual simula los flujos encontrados en sistemas de filtración por membrana de tipo industrial. En la Figura 2.2 se muestra un esquema del equipo de UF utilizado. La celda de filtración consiste en dos piezas rectangulares de AI, en medio de las cuales se coloca: un espaciador de alimentación, la membrana y un transportador del permeado (en ese orden, formando capas). Cuatro guías aseguran la orientación correcta de las dos unidades de la celda (Figura 2.3). El mecanismo de sellado de la celda provee una presión uniforme a través de una prensa que la contiene y permite operar el sistema hasta 6900 kPa. Para las experiencias se utilizaron membranas planas de PVDF (Synder Filtration, Vacaville, CA, EE.UU.) de 14 x 19 cm con puntos de corte 50 y 100 kDa y un área efectiva de filtración de 140 cm². Sobre las mismas se hizo pasar una suspensión

mixta de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* y *Candida kefyri* (10^4 células/ml) en jugo de manzana de 12 °Brix durante 2 horas a 25 ± 1 °C. Luego se analizaron las situaciones como se detalla en el Protocolo de limpieza y desinfección detallado a continuación.

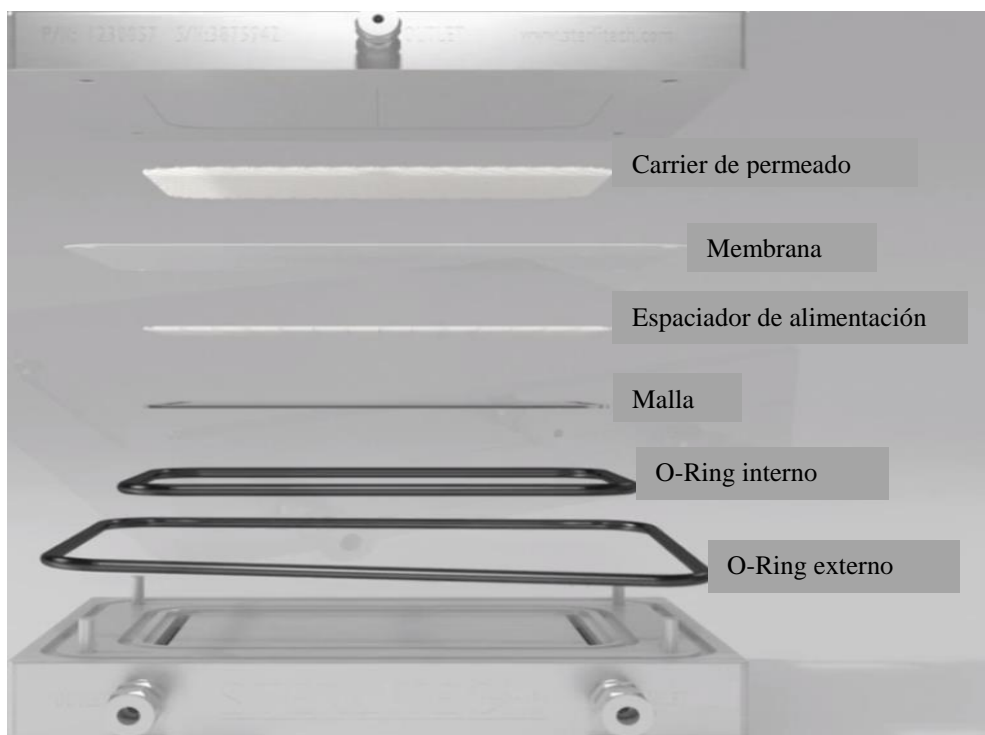
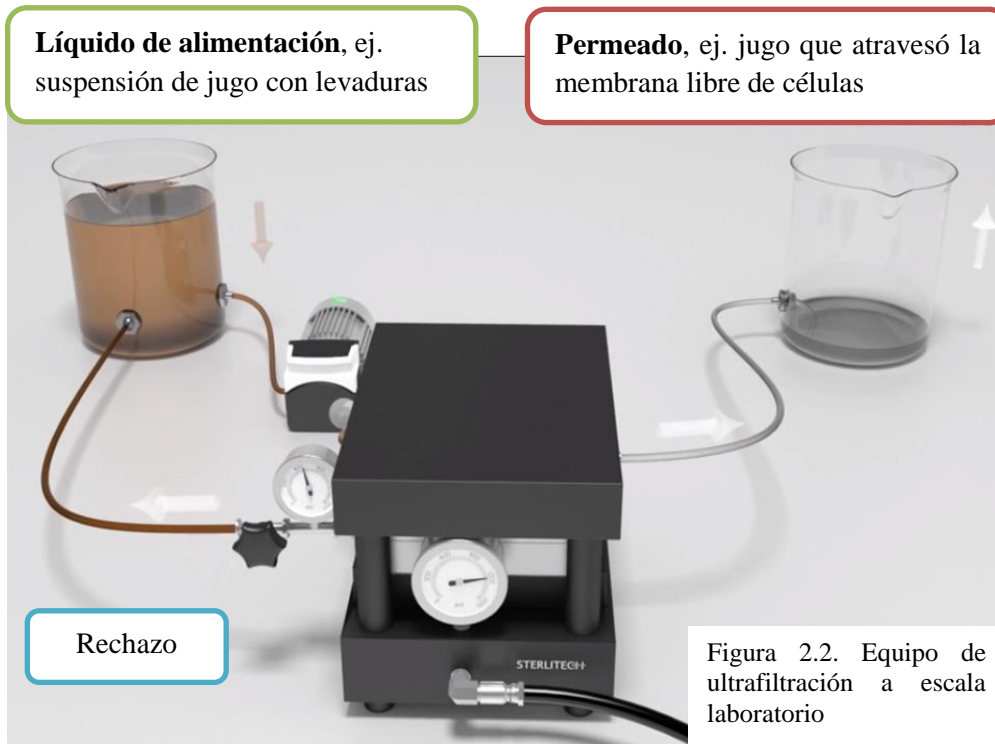
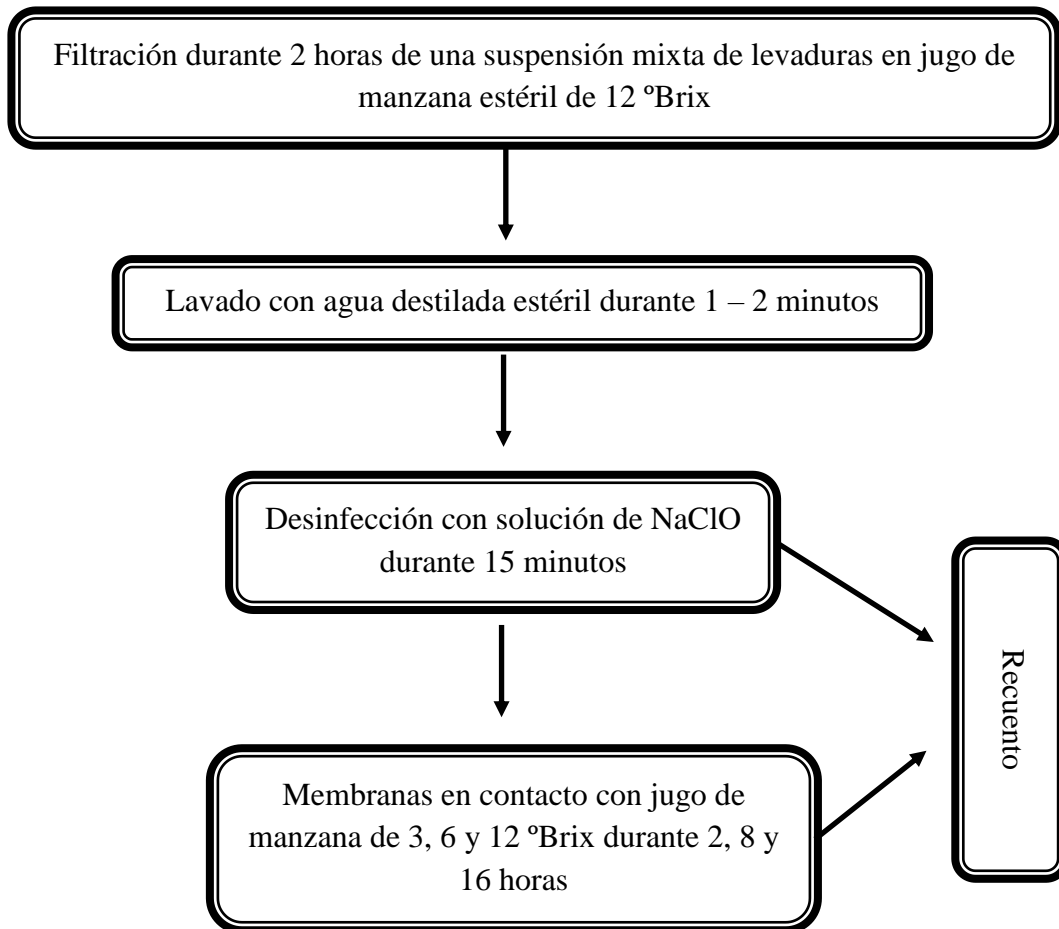


Figura 2.3. Esquema de la celda de filtración utilizada en los ensayos de filtración (Sepa CF System, Osmonics, Minnetonka, MN, EE.UU)

2.3.1. Protocolo de limpieza y desinfección

Durante 2 horas se filtró una suspensión de levaduras en jugo de manzana de 12 °Brix simulando lo que representaría un jugo que llega a la etapa de clarificación con una mezcla de levaduras, como se detalló previamente en la Sección 2.1. Luego se realizó un lavado con agua destilada estéril y se procedió a la etapa de desinfección, haciendo pasar por la membrana soluciones de NaClO (0,20 y 0,50 g Cl/l) durante 15 minutos. Este fue un punto de muestreo donde se procedió al recuento de la comunidad sobreviviente, para lo cual se cortaron con tijeras estériles secciones de 1 cm x 2 cm de las membranas de PVDF y se colocaron en tubos de ensayos con agua peptonada al 0,1 % p/v (Merck) y perlas de vidrio y se agitaron por 10 - 15 minutos para desprender los microorganismos firmemente adheridos a la superficie (Lindsay y Von Holy 1997). Las correspondientes diluciones seriadas se utilizaron para realizar los recuentos en el agar cromogénico CHROMagar *Candida* (CHROMagar Microbiology, Paris, Francia) por técnica de agotamiento en superficie (volumen sembrado 0,2 ml) y en agar YGC por agar volcado. Las placas fueron incubadas a 25 °C ± 1 °C durante 2 y 5 días, respectivamente. Si bien el medio cromogénico CHROMagar *Candida* está destinado a la identificación presuntiva de muestras de origen clínico, en especial de tres especies: *Candida tropicalis* (azul), *Candida albicans* (verde) y *Candida krusei* (rosado), nos permite la diferenciación y ha demostrado ser adecuado para levaduras de origen no clínico (Tornai-Lehoczki y col. 2003). En los casos en los que los colores diferían de los establecidos por este medio (que podrían deberse a *Candida kefyr* y *Rhodotorula mucilaginosa*) la identificación se completó a través de pruebas morfológicas, fisiológicas y la utilización del kit comercial de identificación Rapid ID Yeast Plus system (Remmel, EE.UU.).

Por otro lado se apartaron trozos de membrana que fueron colocados en cajas de Petri modificadas estériles (descritas en el Capítulo 1- Sección 2.6) con jugo de manzana de distintas concentraciones (3, 6 y 12 °Brix) durante 2, 8 y 16 horas simulando el aporte de nutrientes al continuar el proceso productivo y la clarificación de jugo en la planta. Al cabo de cada tiempo se realizó el recuento correspondiente. Los análisis fueron realizados por triplicado.

Protocolo de limpieza y desinfección:**2.4 Análisis estadístico**

En los casos en donde se realizaron recuentos expresados como UFC los mismos fueron transformados a unidades logarítmicas quedando expresadas como Log UFC/cm² ó Log UFC/ml (dependiendo el caso), para aproximarla a la hipótesis de distribución normal.

En todos los casos los análisis se realizaron por triplicado bajo las mismas condiciones en dos ensayos independientes y los resultados se expresaron como Media y Desvío Estándar (Media ± DE).

Se realizó un test *t*-Student cuando fue apropiado para la comparación de medias y se consideraron como resultados estadísticamente significativos aquellos con un nivel de confianza igual o mayor al 95 % ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Ensayos de desinfección sobre células planctónicas

De acuerdo a lo establecido por Mosteller y Bishop (1993) para ser considerados efectivos los desinfectantes deben reducir la cantidad de levaduras en al menos 4 unidades logarítmicas ($EM \geq 4$) en el caso de células planctónicas.

En la Tabla 3.1 se observan los resultados de los ensayos en suspensión de cada una de las especies por separado a los 5 minutos de contacto con el agente desinfectante. En la misma se puede ver que solamente *Rhodotorula mucilaginosa*, cuando es expuesta a una concentración de Cl activo de 0,05 g/l, presenta un $EM < 4$ con 3,68 unidades logarítmicas de reducción frente al valor inicial del que se partió; en el caso de las otras tres especies presentaron reducciones de más de 4 unidades logarítmicas. Por otro lado, cuando las especies fueron expuestas a soluciones de Cl activo de 0,15 y 0,20 g/l a los 5, 10, 15 y 30 minutos, la efectividad del hipoclorito de sodio como agente desinfectante fue del 100%.

Tabla 3.1. Efecto Microbicida (EM) de las concentraciones de uso de hipoclorito de sodio sobre monocultivos de las levaduras en forma plantónica.

Tiempo (minutos)	Hipoclorito de sodio (g Cl/l)			
	0,05	0,15	0,20	1,00
	EM			
5	<i>R.mucilaginosa</i>: 3,66	>4	>4	>4
10	>4	>4	>4	>4
15	>4	>4	>4	>4
30	>4	>4	>4	>4

Por otro lado, cuando se realizó el ensayo de desinfección pero frente a una suspensión mixta de levaduras (Tabla 3.2) se observó que sólo *Rhodotorula mucilaginosa* tuvo una $EM < 4$ (con una reducción de 3,66 unidades logarítmicas) cuando se le expuso durante 5 minutos a una solución de hipoclorito de sodio de 0,05 g/l de Cl. Cuando los tiempos de exposición fueron mayores la efectividad fue del 100% sobre la viabilidad de las células. El hipoclorito de sodio resultó efectivo frente a *Candida krusei*, *C tropicalis*, *C. kefyr* en todas las concentraciones de uso ensayadas y a los diferentes tiempos.

Tabla 3.2. Efecto Microbicida (EM) de las concentraciones de uso de hipoclorito de sodio sobre cultivos mixtos de las levaduras en forma plantónica.

Especies	Hipoclorito de sodio (g Cl/l)		
	0,05	0,15	0,20
	EM		
<i>Candida krusei</i>	>4	>4	>4
<i>Candida tropicalis</i>	4	>4	>4
<i>Candida kefir</i>	>4	>4	>4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3,68	>4	>4

3.2 Ensayos de desinfección sobre células adheridas

En el caso de ensayar un desinfectante ante células adheridas a una superficie, el mismo debe reducir la cantidad de levaduras en al menos 3 unidades logarítmicas para ser considerado efectivo (Mosteller y Bishop 1993). Para esto se realizaron ensayos con una mezcla de *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefir* y *Rhodotorula mucilaginosa* y diferentes tiempos de colonización (2, 8 y 16 horas) sobre superficies de AI y membranas de UF, las mismas fueron sometidas a 5, 10 y 30 minutos a una concentración de NaClO de 0,20 g Cl/l, de manera de ver la eficiencia del desinfectante sobre células adheridas a superficies de uso industrial.

En la Figura 3.1 A y B se muestran los recuentos celulares sobre las superficies de AI y membranas de UF a diferentes tiempos de colonización, antes y después de ser expuestas a la solución de hipoclorito de sodio en los diferentes tiempos ensayados. Los resultados fueron expresados como Log UFC/cm².

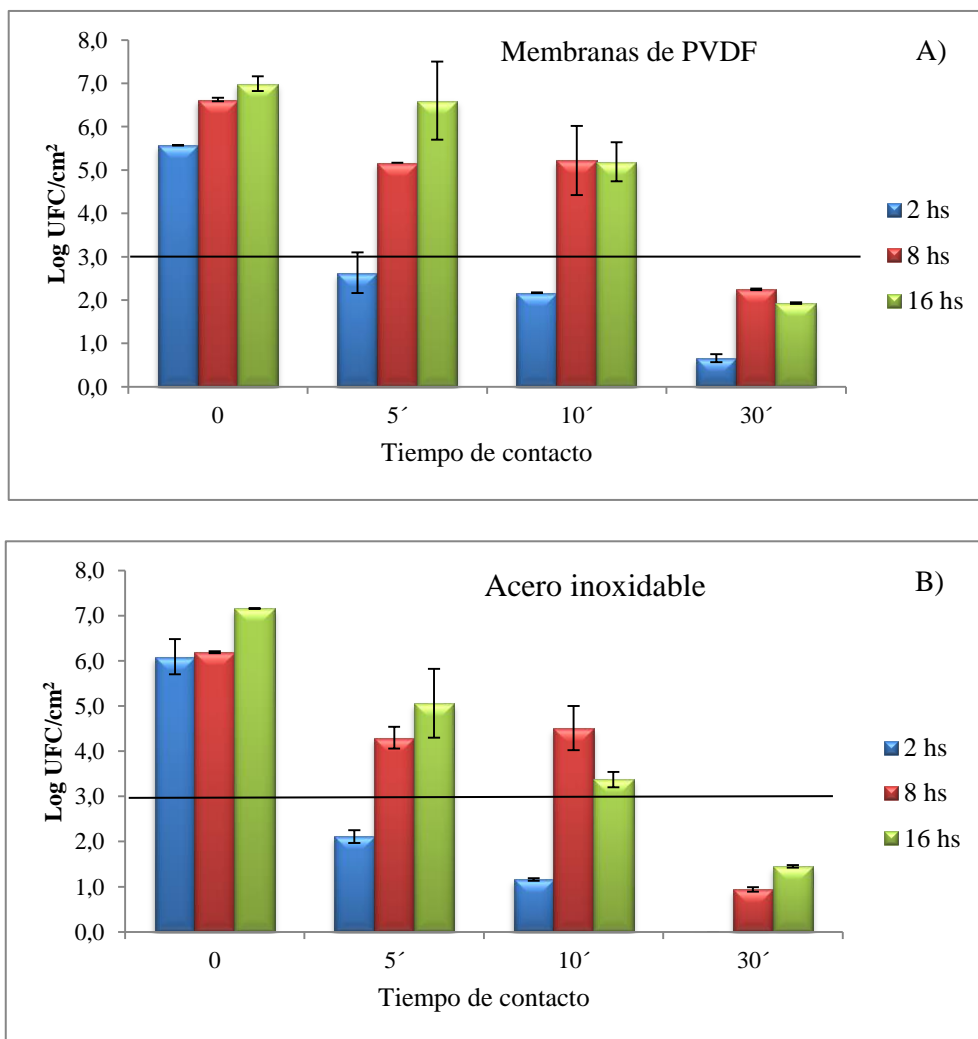


Figura 3.1. Efecto microbicida de una solución de uso de NaClO de 0,20 g Cl/l frente a biofilms mixtos de levaduras sobre: (A) Membranas de ultrafiltración de PVDF y (B) Acero inoxidable. Las líneas negras marcan el límite de un desinfectante para ser reconocido como efectivo. Los resultados están expresados como Log UFC/cm² ± DE.

Tal como puede observarse en las gráficas, a tiempos equivalentes de colonización las superficies de AI presentaron mayores recuentos con un rango de colonización de $6,09 \pm 0,39$ y $7,16 \pm 0,01$ Log UFC/cm² mientras que para las membranas de UF los recuentos fueron de $5,57 \pm 0,004$ y $6,99 \pm 0,17$ Log UFC/cm².

A los 5 minutos de exposición sólo las células adheridas durante 2 horas sobre la membrana de UF presentaron un EM < 3, mientras que en el caso del AI las células presentaron una disminución del número de células mayor a 3 unidades logarítmicas. En los restantes tiempos de exposición al NaClO, si bien las membranas presentaron menores reducciones en comparación con el AI, en ambos casos fueron de más de 3 unidades logarítmicas, siendo de 3,40 y 4,91 unidades logarítmicas a los 10 y 30

minutos, respectivamente, para las membranas de UF, y 4,93 y 6,00 unidades logarítmicas a tiempos equivalentes para el AI. A medida que los tiempos de colonización aumentaron a 8 y 16 horas las reducciones en la comunidad de células adheridas disminuyeron a un rango entre 0,39 y 1,80 unidades logarítmicas para los recuentos sobre las membranas de UF a los 5 y 10 minutos de contacto con la solución de NaClO. Por otro lado analizando la superficie de AI las reducciones fueron mayores con rangos entre 1,68 y 3,79 frente a un contacto de 5 y 10 minutos con la solución desinfectante. Al cabo 2 horas de adhesión y de 30 minutos de exposición a una concentración de Cl de 0,20 g/l los patrones de reducción de células viables fueron más marcados en el caso de las superficies de AI en donde no hubo sobrevivientes, mientras que en el caso de las membranas la población remanente fue de $0,66 \pm 0,09$ Log UFC/cm². A medida que los tiempos de colonización aumentan a 8 y 16 horas, si bien las reducciones oscilaron en 5 unidades logarítmicas, parte de la comunidad sobrevivió con recuentos de $0,94 \pm 0,05$ y $1,45 \pm 0,03$ Log UFC/cm², respectivamente para el AI; mientras que en las membranas los recuentos celulares fueron de $2,25 \pm 0,02$ y $1,93 \pm 0,02$ Log UFC/cm² a las 8 y 16 horas.

En general para ambas superficies, en el caso de los cultivos mixtos en donde las células se encuentran adheridas, al aumentar los tiempos de colonización las mismas mostraron una mayor resistencia a la solución de NaClO. Luego de 16 horas de adhesión y 30 minutos de exposición al NaClO, se realizaron observaciones por microscopia de epifluorescencia y se observó que las células adheridas sobre el AI, una vez teñidos con FDA, se encontraban metabólicamente activas como puede verse en la Figura 3.2. Resultados similares se obtuvieron con las membranas de UF.

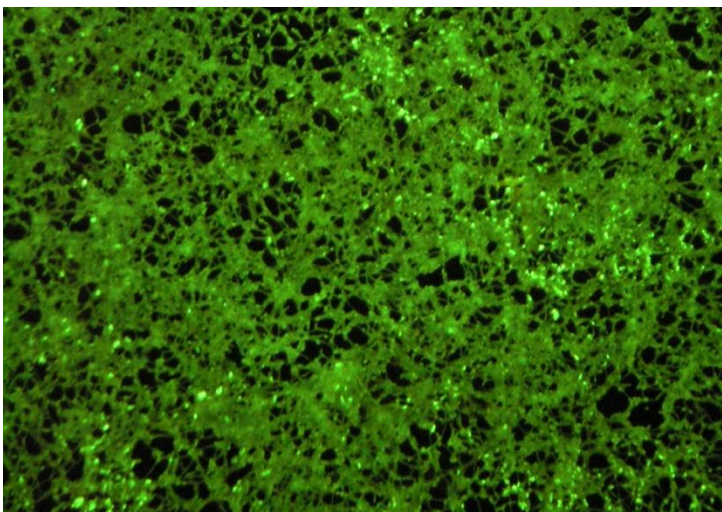


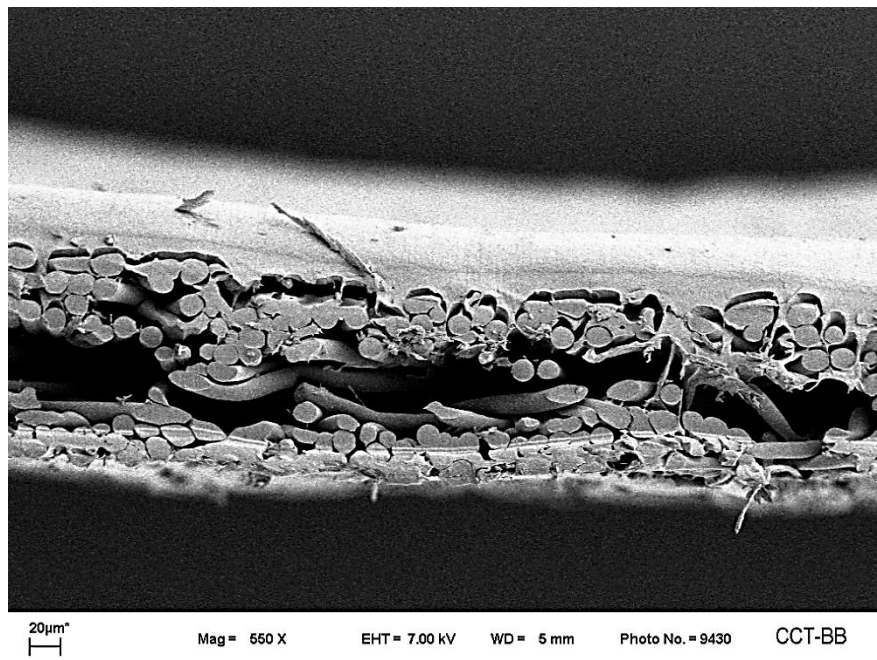
Figura 3.2. Fotografía obtenida por microscopia de epifluorescencia de un biofilm mixto de levaduras luego de 16 horas de colonización y una exposición de 30 minutos a una solución de 0,20 g Cl/l NaClO.

3.3 Ensayos de adhesión en sistemas de filtración por membrana

Para el estudio del comportamiento de las especies de levaduras en condiciones de filtración equivalentes a las encontradas en las plantas productoras de jugo, se utilizó una celda de filtración de flujo tangencial a escala laboratorio. A lo largo de los ensayos se midió el comportamiento del caudal a lo largo del tiempo de filtración.

En primer lugar se muestran en la Figura 3.3 imágenes obtenida por SEM de una sección de membrana virgen de PVDF de 100 kDa de punto de corte y en la Figura 3.4 el control correspondiente a 2 horas de filtración de una muestra de jugo de manzana con un cultivo mixto de levaduras, simulando así que las mismas provienen de la materia prima o como contaminación de etapas previas del proceso productivo. En la Figura 3.4 se puede ver como las levaduras se adhieren tanto a la parte activa de la membrana encargada del proceso de filtración como a las fibras que actúan de soporte; aquellas que pudieron atravesarla no solo se adhieren a las fibras sino que comienzan a multiplicarse.

Si bien en las experiencias se utilizaron membranas de 100 y 50 kD de punto de corte las imágenes de SEM que se mostrarán serán de 100 kDa de forma ilustrativa de lo que sucede en el proceso de *biofouling*.



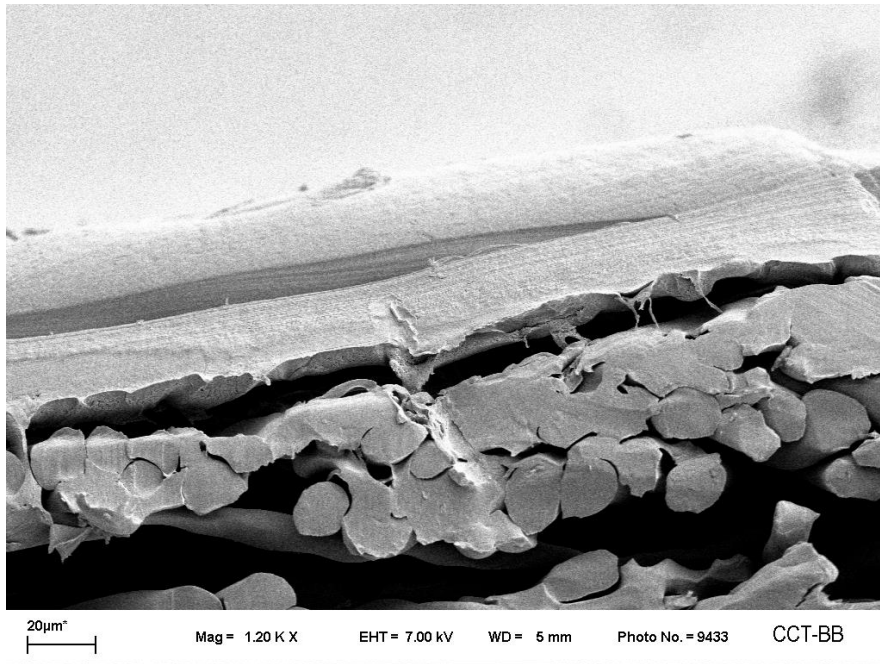
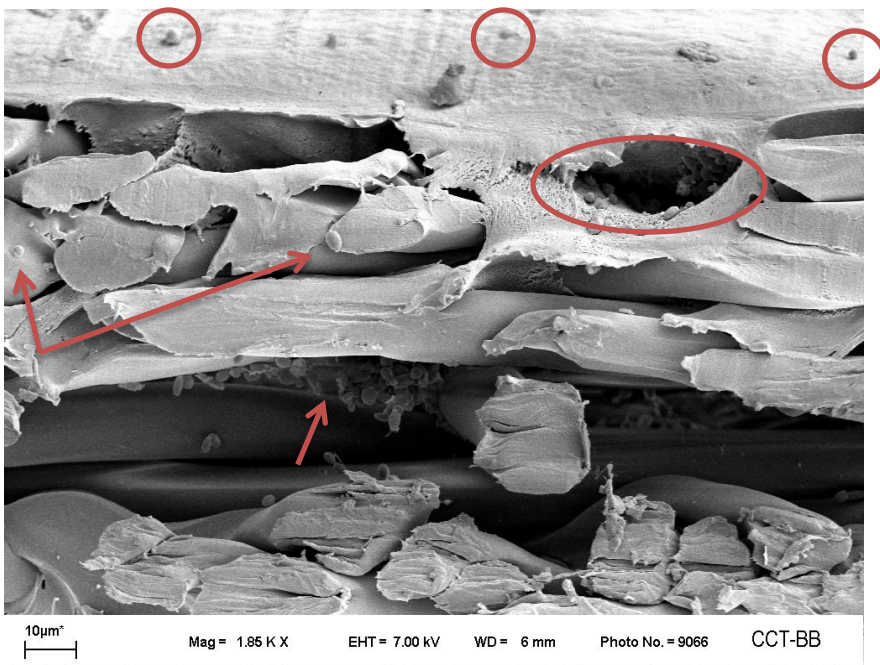


Figura 3.3. Imágenes obtenidas por SEM de membranas de PVDF de 100 kDa de punto de corte. En la misma se puede ver la porción activa de filtración y el soporte de la misma.



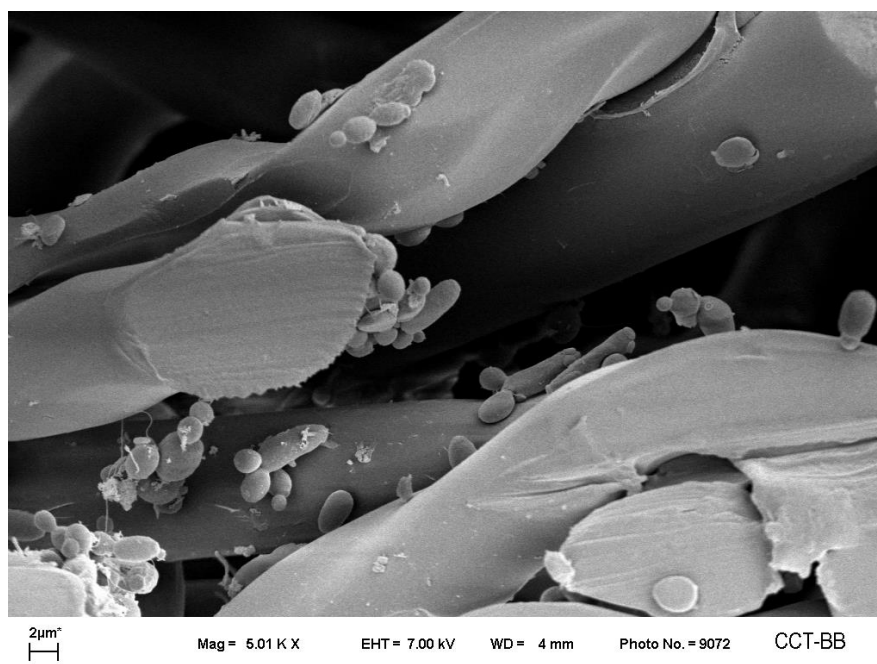


Figura 3.4. Imágenes obtenidas por SEM de membranas de ultrafiltración de PVDF luego de 2 horas de filtración de una suspensión en jugo de manzana de 12°Brix de *Candida krusei*, *C.tropicalis*, *C.kefyr* y *R.mucilaginosa*. Los círculos y flechas rojas algunas de las zonas comprometidas por las levaduras adheridas.

3.4 Protocolo de limpieza y desinfección

Luego de 2 horas de filtración las membranas de PVDF de 50 y 100 kDa de punto de corte fueron sometidas a soluciones de hipoclorito de sodio de 0,20 y 0,50 g Cl/l durante 15 minutos, tiempo al cabo del cual se realizaron los correspondientes recuentos. Luego se dejaron muestras de membrana en jugo de distintas concentraciones (3, 6 y 12 °Brix) durante 2, 8 y 16 horas. Los resultados se muestran en la gráfica de las Figuras 3.5 y 3.6.

Tal como puede verse en las gráficas luego de 2 horas de filtración se obtuvieron recuentos de $4,62 \pm 0,17$ Log UFC/cm² en el caso de las membranas de 100 kDa de punto de corte (Figura 3.5) representados por: *R. mucilaginosa* (7 %), *C. krusei* (39 %), *C. tropicalis* (12 %) y *C. kefyr* (42 %); y de $4,65 \pm 0,45$ Log UFC/cm² cuando se utilizaron membranas de 50 kDa compuesto por: *R. mucilaginosa* (11 %), *C. krusei* (38 %), *C. tropicalis* (11 %), *C. kefyr* (40 %) (Figura 3.6).

Luego de ser sometidas a soluciones de 0,20 g Cl/l durante 15 minutos se calculó un EM de 2,07 y 3,35 Log UFC/cm² para las membranas de 100 y 50 kDa, respectivamente. En cambio, frente a una concentración de 0,50 g Cl/l durante 15 minutos no se encontraron células sobrevivientes (Figura 3.5 B y 3.6 B).

Cuando las muestras de membranas fueron puestas en contacto con jugo de distintas concentraciones para ver la potencial recuperación de las especies, se observó que a 0,50 g Cl/l no hubo recuperación, mientras que a 0,20 g Cl/l hubo una recuperación que no dependió del tiempo ya que las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). En el caso de las membranas de 100 kDa en contacto con jugo de 6 y 12 °Brix se llegó a una recuperación máxima del 75 y 100 % respectivamente, mientras que los valores fueron menores cuando se analizó lo sucedido para las membranas de 50 kDa con una recuperación máxima de 48 y 57%, respectivamente.

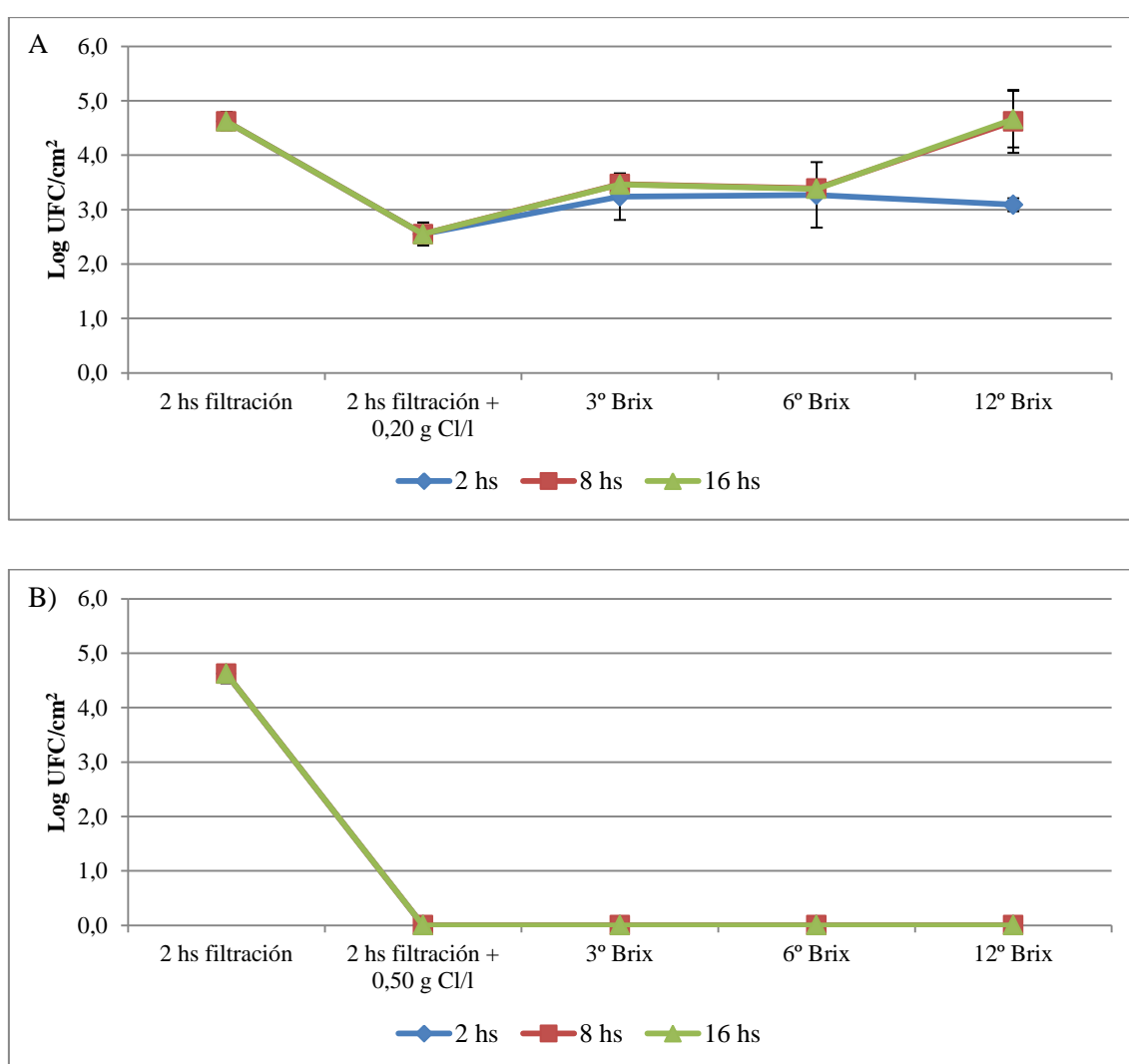


Figura 3.5. Filtración a través de una membrana de PVDF de 100 kDa, de una suspensión mixta de levaduras en jugo de manzana seguido de un paso de desinfección y recuperación en jugos de 3, 6 y 12 °Brix. Se utilizaron dos soluciones de NaClO: (A) 0,20 g/l de Cl y (B) 0,50 g/l de Cl. Los resultados están expresados como Log UFC/cm².

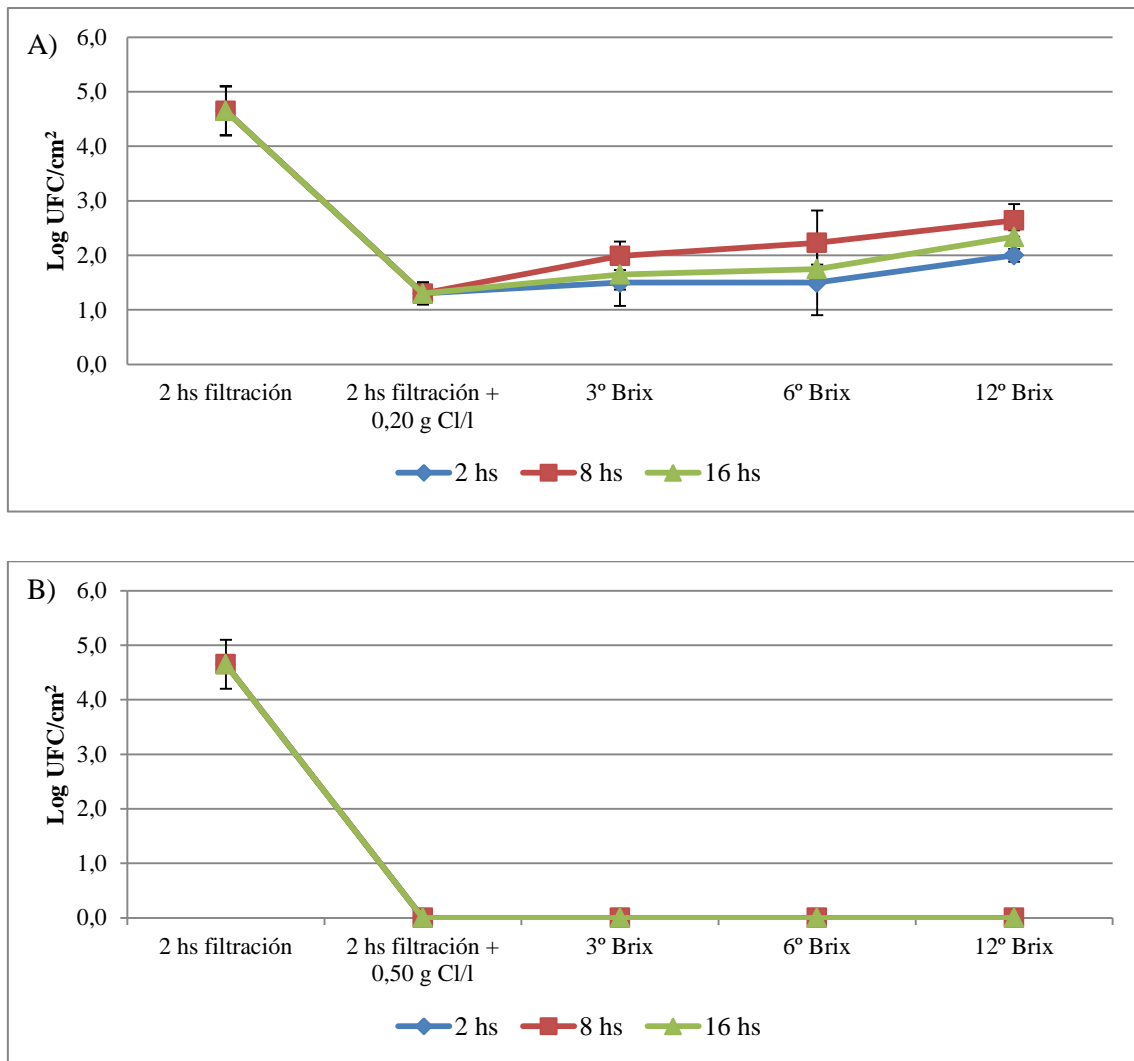


Figura 3.6. Filtración a través de una membrana de PVDF de 50 kDa, de una suspensión mixta de levaduras en jugo de manzana seguido de un paso de desinfección y recuperación en jugos de 3, 6 y 12 °Brix. Se utilizaron dos soluciones de NaClO: (A) 0,20 g/litro de Cl y (B) 0,50 g/litro de Cl. Los resultados están expresados como Log UFC/cm².

En las Figuras 3.7 y 3.8 se muestran imágenes obtenidas por SEM de las membranas colocadas 2 y 8 horas, respectivamente, en jugo de 3 y 6°Brix. En ambas Figuras se pueden ver células sobre la superficie de la membrana y también en su interior, en la porción de soporte.

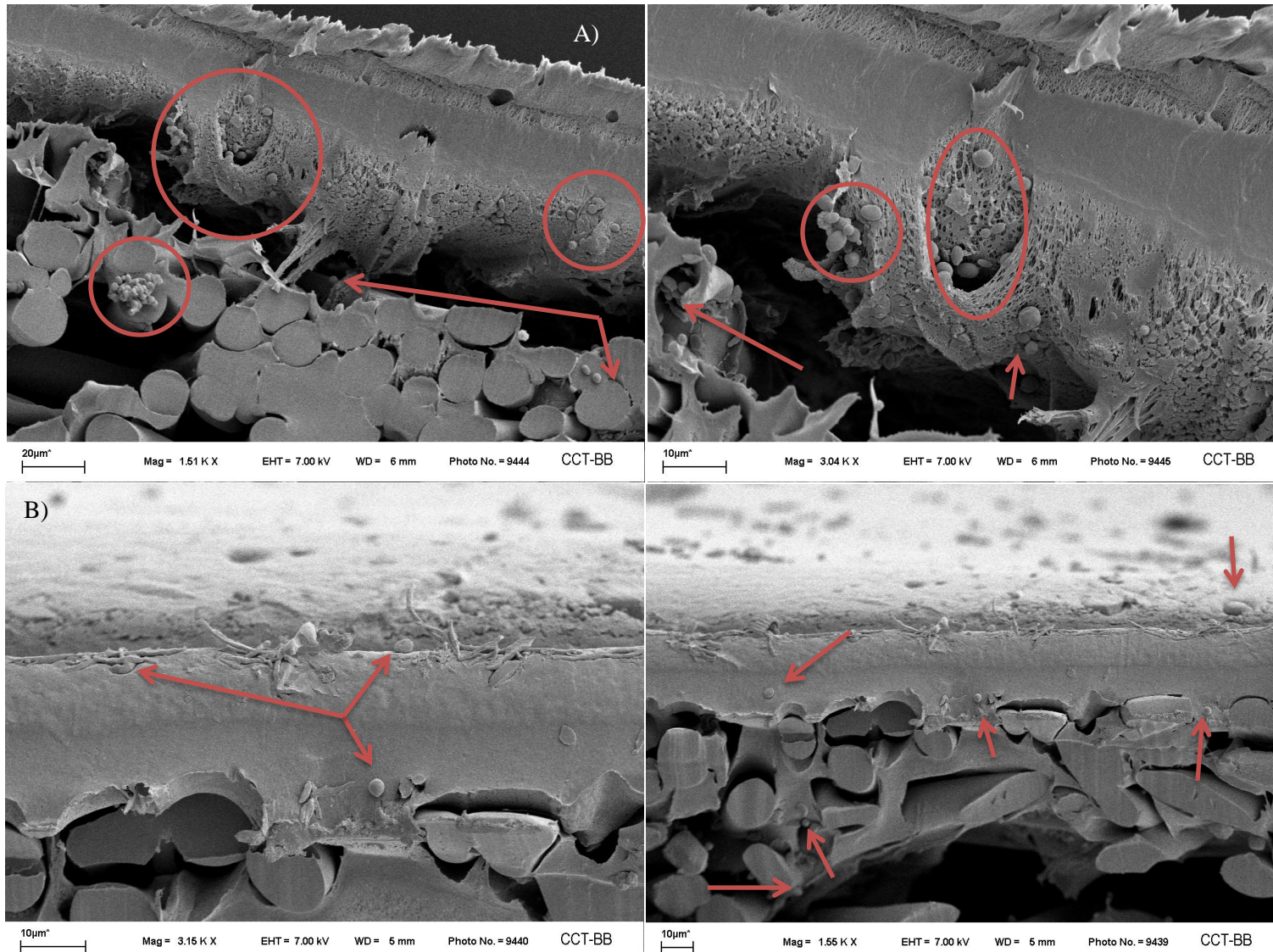


Figura 3.7. Imágenes de SEM de membranas de PVDF de 100 kDa de punto de corte luego del proceso de filtración de una suspensión mixta de levaduras en jugo de manzana seguido de un paso de desinfección con 0,20 g Cl₂/l de NaClO y 2 horas de recuperación en jugos de: (A) 3 °Brix y (B) 6 °Brix. Los círculos y flechas rojas algunas de las zonas comprometidas por las levaduras adheridas.

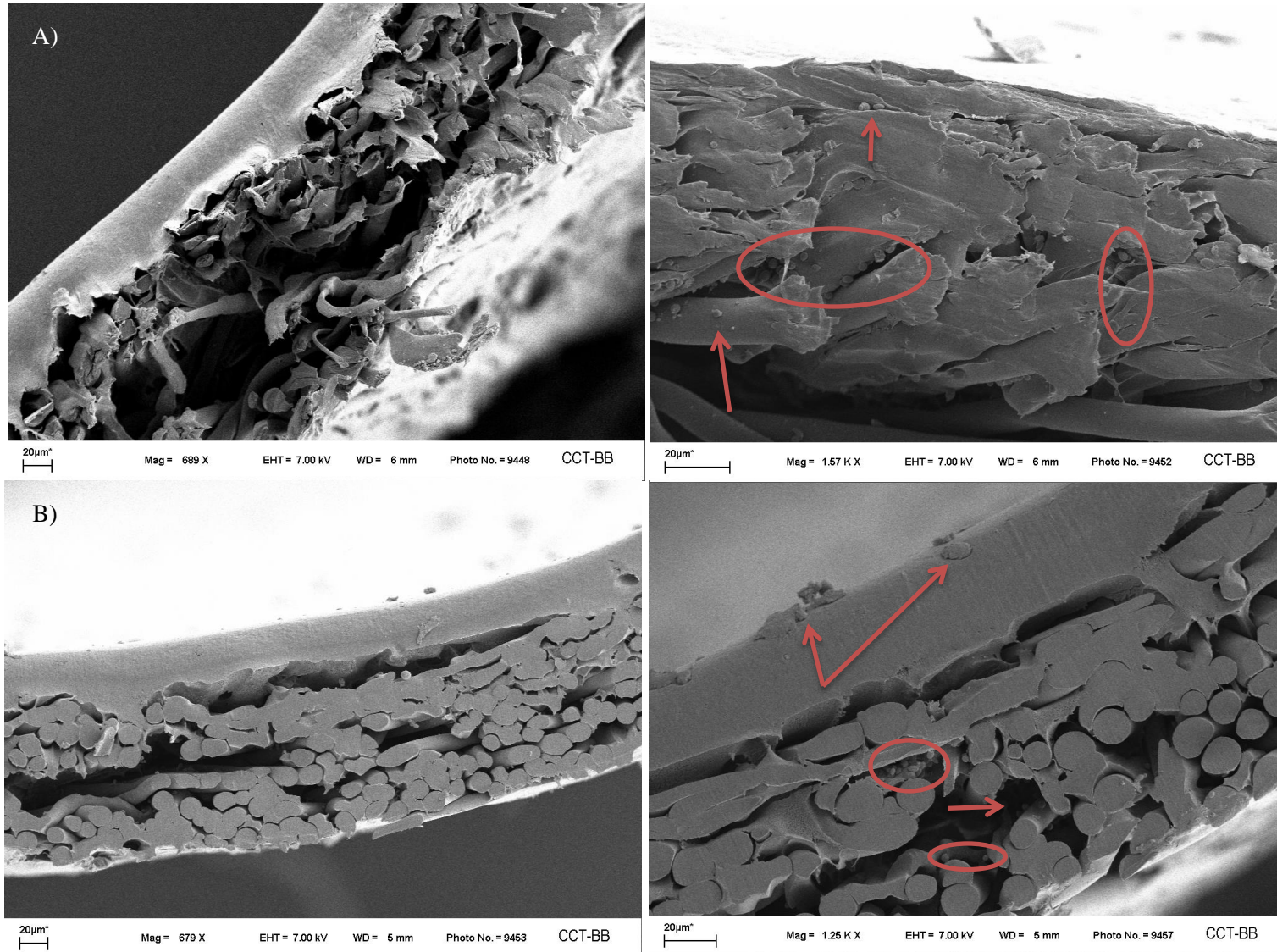


Figura 3.8. Imágenes de SEM de membranas de PVDF de 100 kDa de punto de corte luego del proceso de filtración de una suspensión mixta de levaduras en jugo de manzana seguido de un paso de desinfección con 0,20 g Cl/l de NaClO y 8 horas de recuperación en jugos de: (A) 3 °Brix y (B) 6 °Brix. Los círculos y flechas rojas algunas de las zonas comprometidas por las levaduras adheridas.

En la Figura 3.9 A y B se ve la caída en el flujo de permeado a lo largo del tiempo, el cual independientemente de la membrana, se ve reducido hasta el punto en el cual se hace circular la solución de hipoclorito de sodio (tanto de 0,20 como de 0,50 g Cl/l) en donde el caudal se recupera en un 100%.

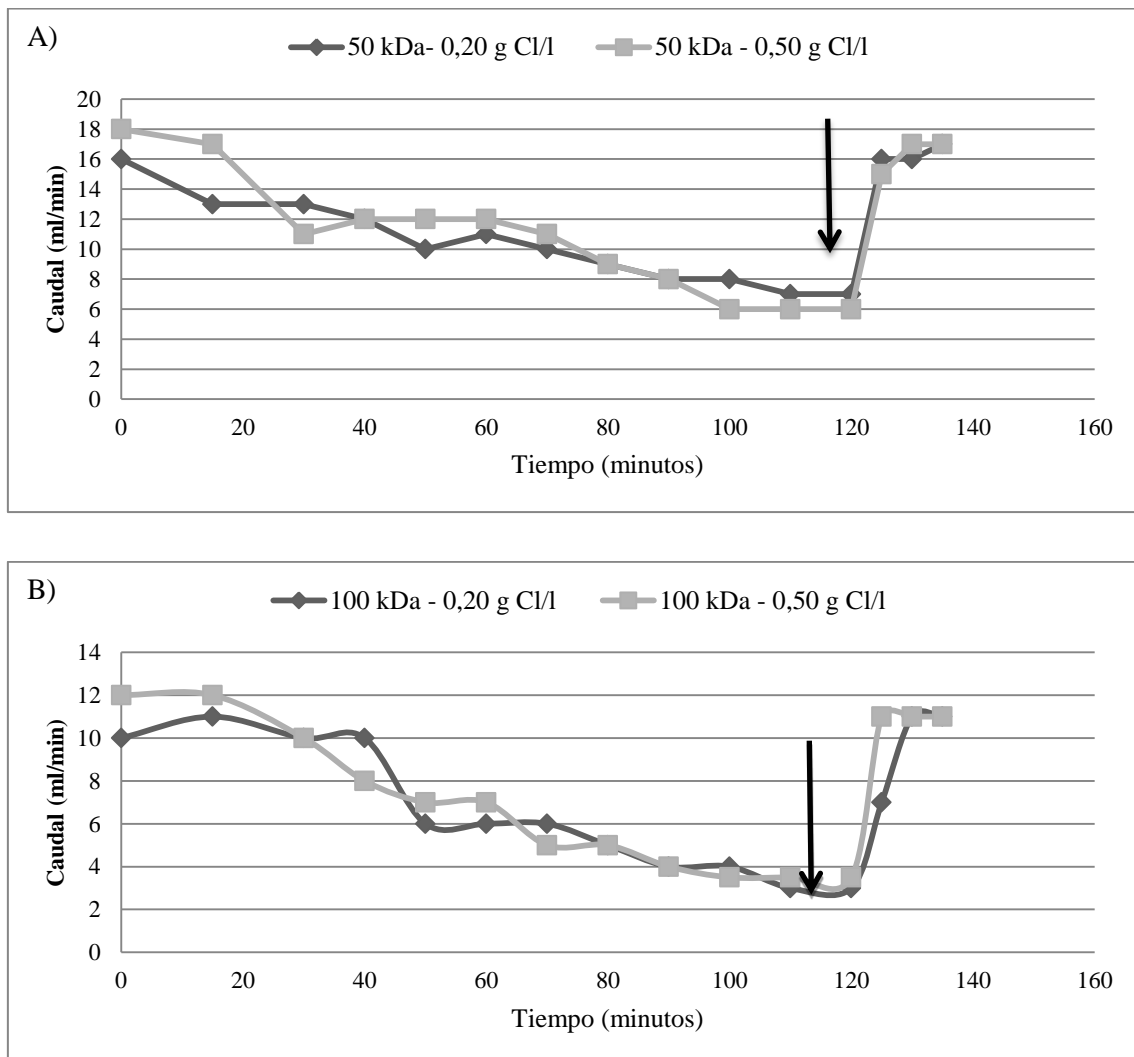
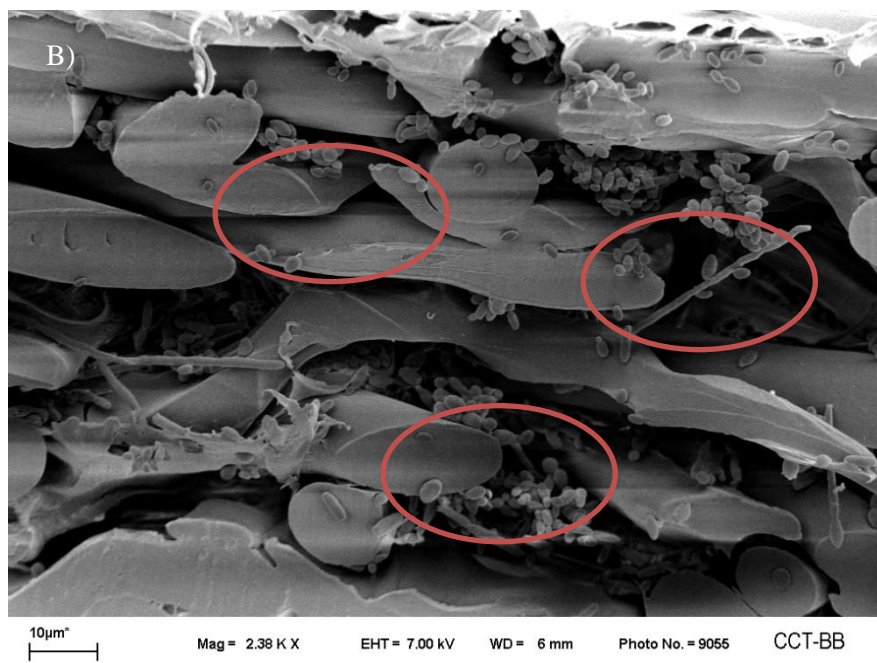
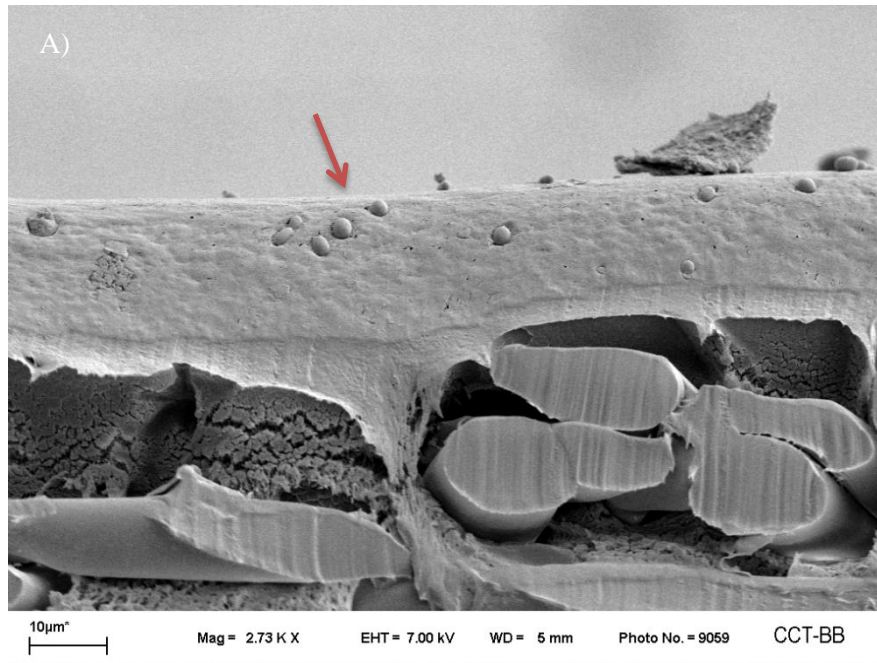


Figura 3.9. Evolución de la reducción del caudal a lo largo del tiempo. Las flechas indican cuando se hicieron circular las soluciones de hipoclorito de sodio. (A) Membrana de 50 kDa de punto de corte y (B) membrana de 100 kDa de punto de corte.

En la Figura 3.10 se muestran imágenes obtenidas por SEM de las membranas desinfectadas con una solución de NaClO de 0,20 g Cl/l durante 15 minutos y luego puestas 16 horas en contacto con jugo de 3, 6 y 12 °Brix. En la misma puede apreciarse la presencia de diferentes morfologías, encontrándose blastosporas como así también pseudohifas.

En todos los casos la comunidad resultante consistió en un predominio de *Candida krusei* y *Candida kefyr*, seguido por *Candida tropicalis* y *Rhodotorula mucilaginosa*, con porcentajes que oscilaron entre 30 - 40%, 10 - 20% y 1 - 10% respectivamente.



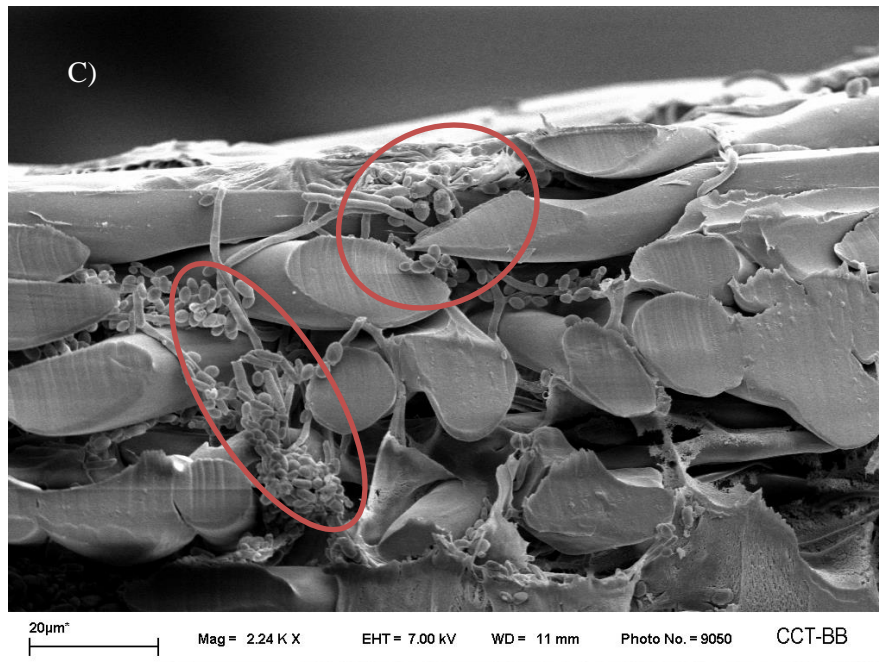


Figura 3.10. Imágenes de SEM de membranas de PVDF de 100 kDa de punto de corte luego del proceso de filtración de una suspensión mixta de levaduras en jugo de manzana seguido de un paso de desinfección con 0,20 g Cl/l de NaClO y 16 horas de recuperación en jugos de: (A) 3 °Brix, (B) 6 °Brix y (C) 12 °Brix.

4. DISCUSIÓN

En los últimos años tanto los estudios de biofilms como de los mecanismos de erradicación han ido en auge debido a la seria problemática que representan. Las células asociadas a la biofilms se unen de manera irreversible a las superficies y requieren de técnicas de eliminación que muchas veces son abrasivas, incluyendo raspado y /o desinfectantes químicos tales como el cloro (Palmer y col. 2007). Por otra parte, los biofilms dentro de las plantas productoras de alimentos sirven como depósitos de microorganismos que pueden contaminar distintas etapas en las líneas de producción, creando un potencial peligro para la salud (Wong 1998; Den Aantrekker y col. 2003).

Una vez que se ha establecido un biofilm dentro de la compleja arquitectura de las membranas, la presencia de EPS y la resistencia de los microorganismos a los agentes antimicrobianos hacen que la eliminación del mismo sea difícil (Ofek y col. 2003). Los procesos de limpieza eliminan parte de los microorganismos sésiles pero sólo parcialmente el EPS en la capa superficial. Por lo tanto, el establecimiento de los biofilms se ve favorecido por una combinación de procesos de limpieza y/o desinfección parcialmente eficientes (Houari y col. 2008).

Las células que sobreviven al proceso de desinfección tienen el potencial de actuar como fuente de futuras contaminaciones. Si en los subsecuentes ciclos de sanitización la dosis del desinfectante está por debajo de la adecuada (dosis subletal), las células pueden sobrevivir a un segundo ciclo de sanitización y, en los períodos en que están expuestas al alimento, proliferar. Cuando ocurre esto, la planta de procesado de alimentos acarrea una población microbiana que no responde (resistente) a la concentración de uso del desinfectante. En resumen, si un desinfectante se aplica por debajo de la dosis letal o por intervalos cortos, el resultado final es la selección de células resistentes, que además conlleva el riesgo de favorecer el anclaje de patógenos y otros microorganismos difíciles de eliminar.

El proceso de *fouling* como ya se ha mencionado es uno de los principales obstáculos para el uso eficiente de las tecnologías de membranas tanto para las industrias alimentarias como para el tratamiento de aguas (Riedl y col. 1998; Khan y col. 2011; Houari y col. 2013). En estas el ensuciamiento lleva a una pérdida severa en el rendimiento y a la implementación de cada vez más complicados y costosos protocolos de limpieza. A su vez, la disminución en la presión de filtrado es consecuencia de una serie de fenómenos entre los que se encuentra la polarización de la concentración dada

por la acumulación de partículas en la superficie (Bian y col. 2000; Thorsen 2004), adsorción y bloqueo de poros por deposición de partículas orgánicas e inorgánicas llevando a un efecto de histéresis (Childress y Elimelech 1996; Broeckmann y col. 2006; Jermann y col. 2007), y el proceso de *biofouling* como consecuencia de la deposición de microorganismos (Di Martino y col. 2007).

Varios trabajos han establecido que las células que forman parte de un biofilm son más resistentes a las estrategias convencionales de desinfección que aquellas en estado planctónico y más difíciles de erradicar (Simoes y col. 2010). Las células en su estado sésil, y más aún si están inmersas en una matriz de exopolisacáridos, son entre 100 y 1000 veces más resistentes que sus formas planctónicas (Stewart y Costerton 2001; Smith y Hunter 2008). Los resultados de nuestras experiencias mostraron que el EM del NaClO sobre las células adheridas, tanto sobre AI como en membranas de UF, fue menor que el EM sobre células planctónicas. Tal como se observó en las Tablas 3.1 y 3.2, junto con la Figura 3.1, una vez adheridos los microorganismos son capaces de sobrevivir hasta 30 minutos de exposición al hipoclorito de sodio. A su vez, a medida que aumenta el tiempo de colonización y el desarrollo de los biofilms, la eficacia del desinfectante disminuye.

En ambientes industriales coexisten muchas especies dentro de un biofilm aumentando la heterogeneidad biológica y bioquímica de la matriz del mismo, por lo tanto los protocolos que se utilicen para la limpieza y desinfección deben estar compuestos por desinfectantes de amplio espectro microbicida, o bien una mezcla de diferentes compuestos, con el costo económico, entre otros, que esto conlleva. Hay que tener en cuenta al aplicar estrategias alternativas las posibles interacciones con los componentes propios de los alimentos (Augustin y col. 2004).

Antes de la fase inicial de adhesión, comienza a formarse sobre la superficie una capa de acondicionamiento de compuestos orgánicos presentes en el medio líquido permitiendo las primeras uniones célula-sustrato (Farhat y col. 2016), a esto se suma la posterior formación de una matriz que los protege y que ellos secretan. Si bien los tiempos de ensayo son lo suficientemente cortos como para hablar de un biofilm maduro, se podría suponer que a medida que aumenta el tiempo de contacto con la materia prima, en este caso jugo de manzana, las poblaciones de microorganismos aumentan aún luego de los procesos de limpieza y desinfección. Esto podría ser consecuencia de un sistema que les provee una protección y que les acarrea periodos de

recuperación cada vez más cortos. Un ejemplo de lo anterior es cuando luego de aplicarse una solución biocida las cepas son puestas en contacto con jugos de distintas concentraciones, y lo que se ve es una recuperación de las mismas a la menor concentración de uso.

Tal como lo expuso Houari y col. (2008) para biofilms formados en membranas de nano filtración, estos están organizados como una red entre la misma membrana y la matriz del biofilm, compuesta principalmente por sustancias extracelulares. Estas sustancias son producidas por los microorganismos de manera de sobrevivir a determinados microambientes dados por ejemplo por las presiones de filtrado impuestas. A su vez, las membranas de filtración, como pudo verse en las imágenes de SEM, presentan una topografía que les provee de refugio a las células en comparación con lo que sucede en el caso de las superficies de AI en las que se encuentran más expuestas a los agentes desinfectantes. Esto se vio en los ensayos en donde el EM fue menor en el caso de las membranas en comparación con la superficie de AI, siendo del orden de 0,65 a 2 unidades logarítmicas para biofilms de 16 horas expuestos a 30 minutos a soluciones de NaClO de 0,20 g Cl/l, la concentración de uso recomendada desinfección de superficies en contacto con alimentos.

El desarrollo de biofilms en los sistemas de filtración también ha sido asociado a disminuciones en la humectabilidad y permeabilidad de las membranas (Houari y col. 2013) lo cual fue observado en los ensayos en donde se observó una caída en el flujo de permeado a lo largo de las 2 horas de filtración de la experiencia. Esto lleva a aumentos progresivos en las presiones de filtrado que llevan al desarrollo de biofilms cada vez más compactos en sistemas de altos esfuerzos de corte. Houari y col. (2013) observaron que estos biofilms presentaban una mayor proporción de polisacáridos que aquellos desarrollados bajo condiciones de menor esfuerzo. Un aumento en la proporción de polisacáridos podría llevar a una mejor cohesión de las células en el biofilms protegiéndolos y aumentando su resistencia al flujo. Se ha reportado que la resistencia de los biofilms a los diversos desafíos enfrentados en ambientes industriales (fuerza de arrastre, compuestos químicos, procesos térmicos, etc.) se puede atribuir en gran medida a la estructura del EPS (Flemming y Wingender 2010). El EPS forma parte del esqueleto central que mantiene la estructura tridimensional de los biofilms (Hall-Stoodley y col. 2004; Flemming y Wingender 2010) en donde los principales

componentes son polisacáridos extracelulares, proteínas y ADN, los cuales están distribuidos entre las células en un patrón heterogéneo (Flemming y Wingender 2010).

La mayoría de los estudios de formación de biofilms en membranas se han realizado en los sistemas utilizados para la purificación de agua, en donde se ha observado que las primeras colonias se evidencian a partir de las 16 horas de operación (Ivnitsky y col. 2007), en nuestro caso como puede evidenciarse en la Figura 3.4 ya comienzan a verse células adheridas que comienzan a dividirse y formar pequeñas colonias en la superficie y el interior de las membranas a partir de las 2 horas. Esta última condición se agrava aún más cuando las mismas fueron puestas en presencia de jugo de bajo, medio y alto contenido de azúcares (Figura 3.10).

El proceso de *biofouling* es uno de los mecanismos menos comprendidos y controlados que se dan en estos sistemas, a pesar de la importancia que significa su presencia. Si bien en los últimos años se han profundizado los estudios para tratar de comprender la formación de biofilms, la dinámica de los mismos ya sea en membranas de UF, NF como de OI es un campo aún poco explorado (Khan y col. 2011).

La influencia de los nutrientes en el proceso de *biofouling* es evidente y crucial. La presencia de nutrientes (en nuestro caso las distintas concentraciones de jugo) permite el incremento de las células que sobrevivieron al proceso de desinfección. Tal como lo plantean varios autores (Brugnoni y col. 2012; Dionisio-Ruiz y col. 2014) los biofilms pueden desarrollarse incluso después de la aplicación de procesos de cloración. En el caso de Rojas-Serrano y col. (2015) realizando autopsias de membranas de UF, con un pre-tratamiento de coagulación, observó que el afluente con materia orgánica actuaba como una barrera protectora de los biofilms. Por ejemplo, en el caso del agua su pre-tratamiento ayuda a disminuir la carga de nutrientes y limita la extensión del crecimiento del biofilm en las membranas (Huang y col. 2009; Huck y col. 2011; Peldszus y col. 2012), siendo una forma de intervención. Si bien estas estrategias de control ayudan a reducir el efecto perjudicial del *biofouling* en el flujo de permeado, en la práctica la formación de biofilms en sistemas de separación por membrana no puede ser eliminado por completo (Simões y col. 2010).

Es importante señalar que la mayoría de los procesos de desinfección que se implementan se basan en los resultados de ensayos con células planctónicas. Sin embargo, tales pruebas no representan el comportamiento de las células dentro de los biofilms y a su vez puede llevar a extrapolaciones erróneas. Idealmente, prevenir la

formación de los biofilms es la opción más lógica que tratar de eliminarlos. Sin embargo, actualmente no existe una técnica que sea capaz de prevenir o controlar con éxito la formación de biofilms sin causar efectos secundarios adversos. La estrategia principal para prevenirlos es limpiar y desinfectar regularmente antes de que los microorganismos se adhieran firmemente a las superficies (Midelet y Carpentier 2004). Si bien existen otras como el recubrimiento y/o modificación de las superficies, prevenir en un 100% la adhesión de los microorganismos no es un objetivo viable.

En resumen, los biofilms representan un gran problema para las industrias alimentarias como principales fuentes de contaminación, causando problemas en el deterioro de alimentos y en la salud pública con brotes de patógenos transmitidos por alimentos. Por lo tanto los mecanismos involucrados en la formación de biofilms y el mantenimiento de su integridad estructural se ha convertido en una de las preocupaciones más importantes de manera de desarrollar estrategias eficientes para controlar los biofilms en instalaciones de procesamiento de alimentos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA-AWWA/WEF (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington DC, EE.UU., American Public Health Association.

Augustin, M., Ali-Vehmas, T. y Atroschi, F. (2004). "Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms." *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **7**(1): 55-64.

Bian, R., Yamamoto, K. y Watanabe, Y. (2000). "The effect of shear rate on controlling the concentration polarization and membrane fouling." *Desalination* **131**(1): 225-236.

Borovec, S., Broumis, C., Adcock, W., Fang, R. y Uren, E. (1998). "Inactivation kinetics of model and relevant blood-borne viruses by treatment with sodium hydroxide and heat." *Biologicals* **26**(3): 237-244.

Broeckmann, A., Busch, J., Wintgens, T. y Marquardt, W. (2006). "Modeling of pore blocking and cake layer formation in membrane filtration for wastewater treatment." *Desalination* **189**(1): 97-109.

Brugnoni, L. I., Lozano, J. E. y Cubitto, M. A. (2012). "Efficacy of sodium hypochlorite and quaternary ammonium compounds on yeasts isolated from apple juice." *Journal of Food Process Engineering* **35**(1): 104-119.

Cassano, A., Donato, L., Conidi, C. y Drioli, E. (2008). "Recovery of bioactive compounds in kiwifruit juice by ultrafiltration." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**(4): 556-562.

Constenla, D. T. y Lozano, J. E. (1997). "Hollow fibre ultrafiltration of apple juice: macroscopic approach." *LWT-Food Science and Technology* **30**(4): 373-378.

Cheryan, M. (1986). Ultrafiltration handbook. Nueva York, EE.UU., CRC Press, 375 p.

Cheryan, M. (1998). Ultrafiltration and microfiltration handbook. Nueva York, EE.UU., CRC press, 552 p.

Childress, A. E. y Elimelech, M. (1996). "Effect of solution chemistry on the surface charge of polymeric reverse osmosis and nanofiltration membranes." *Journal of Membrane Science* **119**(2): 253-268.

Daufin, G., Escudier, J.-P., Carrere, H., Berot, S., Fillaudeau, L. y Decloux, M. (2001). "Recent and emerging applications of membrane processes in the food and dairy industry." *Food and Bioproducts Processing* **79**(2): 89-102.

Den Aantrekker, E. D., Boom, R. M., Zwietering, M. H. y Van Schothorst, M. (2003). "Quantifying recontamination through factory environments—a review." *International Journal of Food Microbiology* **80**(2): 117-130.

Di Martino, P., Doumeche, B., Galas, L., Vaudry, H., Heim, V. y Habarou, H. (2007). "Assessing chemical cleaning of nanofiltration membranes in a drinking water production plant: a combination of chemical composition analysis and fluorescence microscopy." *Water Science and Technology* **55**(8-9): 219-225.

- Dionisio-Ruiz, E., Pérez, J., Plaza, F., Garralón, G., Garralón, A. y Gómez, M. (2014). "Biofilm evolution in the pretreatment line of a reverse osmosis system." *Desalination* **338**: 33-38.
- Dodds, M. G., Grobe, K. J. y Stewart, P. S. (2000). "Modeling biofilm antimicrobial resistance." *Biotechnology and Bioengineering* **68**(4): 456-465.
- Donlan, R. M. y Costerton, J. W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clinical Microbiology Reviews* **15**(2): 167-193.
- Doumèche, B., Galas, L., Vaudry, H. y Di Martino, P. (2007). "Membrane foulants characterization in a drinking water production unit." *Food and Bioproducts Processing* **85**(1): 42-48.
- Echavarría, A., Torras, C., Pagán, J. y Ibarz, A. (2011). "Fruit juice processing and membrane technology application." *Food Engineering Reviews* **3**(3-4): 136-158.
- Evans, L. V. (2003). *Biofilms: recent advances in their study and control*. Reino Unido, CRC press, 490 p.
- Farhat, N., Staal, M., Bucs, S. S., Van Loosdrecht, M. y Vrouwenvelder, J. (2016). "Spatial heterogeneity of biofouling under different cross-flow velocities in reverse osmosis membrane systems." *Journal of Membrane Science* **520**: 964-971.
- Fellows, P. T. y Javier, F. (1993). *Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas*. España, Acirbia, 549 p.
- Flemming, H.-C. y Wingender, J. (2010). "The biofilm matrix." *Nature Reviews Microbiology* **8**(9): 623-633.
- Fortunato, L., Qamar, A., Wang, Y., Jeong, S. y Leiknes, T. (2017). "In-situ assessment of biofilm formation in submerged membrane system using optical coherence tomography and computational fluid dynamics." *Journal of Membrane Science* **521**: 84-94.
- Fouladkhah, A., Geornaras, I. y Sofos, J. N. (2013). "Biofilm formation of O157 and Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella Typhimurium* and Newport and their inactivation by sanitizers." *Journal of Food Science* **78**(6): M880-M886.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. y Stoodley, P. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nature Reviews Microbiology* **2**(2): 95-108.
- Heatherbell, D., Short, J. y Strubi, P. (1977). "Apple juice clarification by ultrafiltration." *Confructa* **22**(5/6): 157.
- Houari, A., Picard, J., Habarou, H., Galas, L., Vaudry, H., Heim, V. y Di Martino, P. (2008). "Rheology of biofilms formed at the surface of NF membranes in a drinking water production unit." *Biofouling* **24**(4): 235-240.
- Houari, A., Seyer, D., Kecili, K., Heim, V. y Martino, P. D. (2013). "Kinetic development of biofilm on NF membranes at the Méry-sur-Oise plant, France." *Biofouling* **29**(2): 109-118.

- Huang, H., Schwab, K. y Jacangelo, J. G. (2009). "Pretreatment for low pressure membranes in water treatment: a review." *Environmental Science & Technology* **43**(9): 3011-3019.
- Huck, P., Peldszus, S., Halle, C., Ruiz, H., Jin, X., Van Dyke, M., y col. (2011). "Pilot scale evaluation of biofiltration as an innovative pre-treatment for ultrafiltration membranes for drinking water treatment." *Water Science and Technology: Water Supply* **11**(1): 23-29.
- Ivnitsky, H., Katz, I., Minz, D., Volvovic, G., Shimoni, E., Kesselman, E., Semiat, R. y 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.
- Jermann, D., Pronk, W., Meylan, S. y Boller, M. (2007). "Interplay of different NOM fouling mechanisms during ultrafiltration for drinking water production." *Water Research* **41**(8): 1713-1722.
- Khan, M. M. T., Stewart, P. S., Moll, D. J., Mickols, W. E., Nelson, S. E. y Camper, A. K. (2011). "Characterization and effect of biofouling on polyamide reverse osmosis and nanofiltration membrane surfaces." *Biofouling* **27**(2): 173-183.
- Lalia, B. S., Kochkodan, V., Hashaikeh, R. y Hilal, N. (2013). "A review on membrane fabrication: Structure, properties and performance relationship." *Desalination* **326**: 77-95.
- Lelieveld, H. L. (2005). Handbook of hygiene control in the food industry. EE.UU., Taylor & Francis 744 p.
- Lelieveld, H. L., Holah, J. y Napper, D. (2014). Hygiene in food processing: principles and practice. Reino Unido, Elsevier, 640 p.
- Liikanen, R., Yli-Kuivila, J. y Laukkanen, R. (2002). "Efficiency of various chemical cleanings for nanofiltration membrane fouled by conventionally-treated surface water." *Journal of Membrane Science* **195**(2): 265-276.
- Lim, Y. P. y Mohammad, A. W. (2011). "Physicochemical properties of mammalian gelatin in relation to membrane process requirement." *Food and Bioprocess Technology* **4**(2): 304-311.
- Lindsay, D. y Von Holy, A. (1997). "Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms." *Food Microbiology* **14**(4): 383-390.
- Lipnizki, F. (2010). Cross-flow membrane applications in the food industry. Membranes for food applications. . EE.UU., Willey: 1-23.
- Lozano, J. E. (2006). Fruit manufacturing. Nueva York, EE.UU., Springer, 230 p.
- Mathusa, E. C., Chen, Y., Enache, E. y Hontz, L. (2010). "Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods." *Journal of Food Protection*® **73**(9): 1721-1736.
- Midelet, G. y Carpentier, B. (2004). "Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food." *Journal of Applied Microbiology* **97**(2): 262-270.

- Mizan, M. F. R., Jahid, I. K. y Ha, S.-D. (2015). "Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge." *Food Microbiology* **49**: 41-55.
- Mohammad, A. W., Ng, C. Y., Lim, Y. P. y 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.
- Mosteller, T. y Bishop, J. (1993). "Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm." *Journal of Food Protection*® **56**(1): 34-41.
- Ofek, I., Hasty, D. L. y Sharon, N. (2003). "Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **38**(3): 181-191.
- Palmer, J., Flint, S. y Brooks, J. (2007). "Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **34**(9): 577-588.
- Peldszus, S., Benecke, J., Jekel, M. y Huck, P. M. (2012). "Direct biofiltration pretreatment for fouling control of ultrafiltration membranes." *Journal American Water Works Association* **104**(7): 45.
- Ridgway, H., Kelly, A., Justice, C. y Olson, B. (1983). "Microbial fouling of reverse-osmosis membranes used in advanced wastewater treatment technology: chemical, bacteriological, and ultrastructural analyses." *Applied and Environmental Microbiology* **45**(3): 1066-1084.
- Riedl, K., Girard, B. y Lencki, R. W. (1998). "Influence of membrane structure on fouling layer morphology during apple juice clarification." *Journal of Membrane Science* **139**(2): 155-166.
- Rojas-Serrano, F., Marín, E., Pérez, J. I. y Gómez, M. Á. (2015). "Autopsy of ultrafiltration membranes for drinking-water production with in-line coagulation and ozonation pre-treatments." *Desalination and Water Treatment*: 1-13.
- Salo, S. y Wirtanen, G. (2005). "Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains." *Food and Bioprocesses Processing* **83**(4): 288-296.
- Simões, L. C., Simoes, M. y 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): 6673-6679.
- Simoes, M., Simões, L. C. y Vieira, M. J. (2010). "A review of current and emergent biofilm control strategies." *LWT-Food Science and Technology* **43**(4): 573-583.
- Smith, K. y Hunter, I. S. (2008). "Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates." *Journal of Medical Microbiology* **57**(8): 966-973.
- Stewart, P., Rayner, J., Roe, F. y Rees, W. (2001). "Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates." *Journal of Applied Microbiology* **91**(3): 525-532.
- Stewart, P. S. (2015). *Biofilm control by antimicrobial agents. Microbial biofilms.* Washington DC, EE.UU., ASM Press: 269-285.

Stewart, P. S. y Costerton, J. W. (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." *The Lancet* **358**(9276): 135-138.

Thorsen, T. (2004). "Concentration polarisation by natural organic matter (NOM) in NF and UF." *Journal of Membrane Science* **233**(1): 79-91.

Tornai-Lehoczki, J., Péter, G. y Dlauchy, 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): 189-200.

Vrouwenvelder, J. y Van der Kooij, D. (2001). "Diagnosis, prediction and prevention of biofouling of NF and RO membranes." *Desalination* **139**(1): 65-71.

Wagner, J. (2001). *Membrane Filtration Handbook-Practical Tips and Hints*. . Minnetonka, EE.UU., Osmonics, Inc. p.

Wong, A. C. L. (1998). "Biofilms in food processing environments." *Journal of Dairy Science* **81**(10): 2765-2770.

CAPÍTULO 4

REOLOGÍA

1. INTRODUCCIÓN

Desde un enfoque fisicoquímico, los biofilms pueden ser vistos como un material compuesto biocoloidal, que consiste en partículas coloidales (células) y componentes de la matriz (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) como parte del gel viscoelástico. Las interacciones en la interfase de estos componentes determinan las propiedades estructurales y el comportamiento reológico del biofilm (Zaccarelli 2007). Hay evidencias que sugieren que las propiedades reológicas de los mismos dependen en gran medida de la microestructura intercelular (Rogers y col. 2008; Wilking y col. 2011). Estas propiedades reológicas y cómo varían las mismas en diferentes ambientes juegan un rol determinante en las fases de acumulación, maduración y dispersión del ciclo de vida de un biofilm (Hall-Stoodley y col. 2004). En particular, una de las aplicaciones más importantes de la reología de biofilms consiste en el conocimiento de los procesos de desprendimiento de los mismos, de importancia crítica en equipos de procesado de alimentos, ya que este fenómeno resulta en la transmisión de patógenos al alimento y hacia otras partes del sistema (Zottola y Sasahara 1994; Hall-Stoodley y col. 2004).

La reología se refiere al estudio del flujo y deformación de las sustancias y en particular su comportamiento en aquellas zonas de transición entre sólidos y líquidos. Esta rama de la física intenta definir una relación entre la tensión que actúa sobre un material dado y la deformación resultante mediante la medición de la fuerza y la deformación a lo largo del tiempo (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas 2005). Todos los materiales tienen propiedades reológicas y su estudio se da en una amplia gama de sectores desde geología y minería (Cristescu 2012), polímeros (Dealy y Wissbrun 2012), medicina (McGrath 1987), bioingeniería (Skalak y col. 1987), cosmética (Laba 1993) y biofilms (Characklis 1981; Characklis y col. 1982). De acuerdo a cómo responden a las deformaciones, los materiales pueden clasificarse en: puramente *elásticos* (o sólidos ideales), puramente *viscosos* (o fluidos ideales) y *viscoelásticos* (estado intermedio entre los anteriores).

En la Figura 1.1 se esquematizan las técnicas utilizadas para la medición de las propiedades reológicas de fluidos y materiales semi-sólidos, a lo cual hay que sumarle la microreología que determina las propiedades reológicas utilizando sondas coloidales directamente en el material blando en estudio (Squires y Mason 2009).

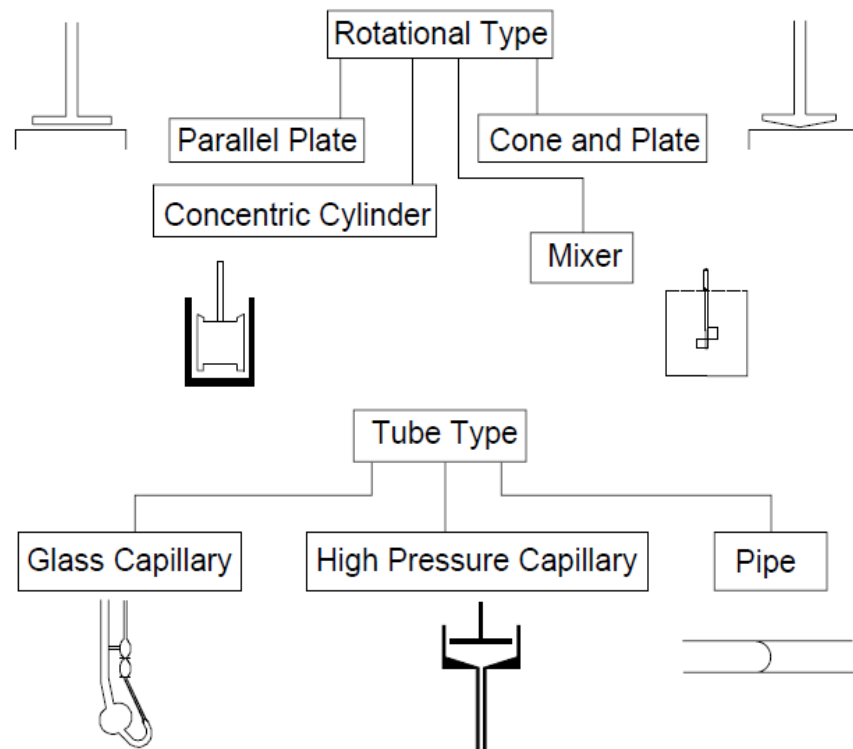


Figura 1.1. Modelos reológicos comúnmente utilizados divididos en dos categorías: rotatorio y de tipo tubo. Esquema extraído de Steffe (1996).

Con el objetivo de describir la respuesta mecánica a diferentes condiciones físicas y/o químicas de sistemas vivos, tanto para el dominio eucariota (Fabry y col. 2001; Wilhelm 2008) como procariota (Klapper y col. 2002; Rupp y col. 2005), se han desarrollado diferentes técnicas reológicas. Tales técnicas incluyen pinzas ópticas, microscopía de fuerza atómica, micropipetas, rastreo de partículas por microreología, etc. (Mofrad 2009; Verdier y col. 2009). Es reconocido que las células combinan las propiedades viscoelásticas de materiales blandos como polímeros, geles, espumas, suspensiones, etc., como también pueden presentar propiedades que están asociadas a sistemas de tipo viscoelásticos. Por otra parte, cuando se las somete a tensiones, las células aisladas pueden desarrollar una respuesta activa, lo que contribuye a la alta complejidad de estos sistemas (Pilavtepe-Çelik y col. 2008). Las propiedades mecánicas influyen en gran medida en los procesos que se dan en los biofilms. A pesar de la importancia del tema, hay muy poca información bibliográfica sobre el análisis reológico de biofilms, debido a la dificultad de medir sus

parámetros viscolásticos *in situ*. Esto último posiblemente debido tanto a la heterogeneidad de los mismos como a su naturaleza gelatinosa que dificultan su manejo. El estudio de la reología *in situ* de los biofilms de levaduras es un paso importante para entender su dinámica en lo que respecta a entornos asociados de la industria alimentaria, ya que mide cómo se unen y se disocian. Uno de los objetivos propuestos en este estudio fue diseñar los accesorios necesarios para medir las propiedades reológicas *in situ* de los biofilms.

Variables tales como disponibilidad y diversidad de nutrientes, tasa de crecimiento o densidad de la biomasa, y características hidrodinámicas del sistema donde se forma el biofilm, entre otros, son conocidos por tener impacto y alterar el comportamiento y estructura espacial de las poblaciones microbianas, situación aún más compleja si hablamos de una comunidad (Nadell y col. 2010).

En los procesos industriales, el diseño geométrico de los equipos, de las tuberías y de los tanques es generalmente complejo, con lo cual los biofilms se desarrollan bajo una amplia distribución de fuerzas hidrodinámicas (Lelièvre y col. 2002; Blel y col. 2007). Las condiciones hidrodinámicas son determinantes en el proceso de adhesión celular a una superficie (Chen y col. 2005). Dependiendo de su ubicación dentro del equipo y de la tensión local aplicada, los biofilms presentan un arreglo, espesor y arquitectura particular y por ende sus propiedades reológicas también varían. La forma y estructura de un biofilm sometido al flujo de un alimento líquido influirá en la transferencia de masa del sistema a lo largo del mismo. Si el biofilm es un material “dócil” la forma variará no sólo por el crecimiento en sí de las células, sino también por las variaciones en la tensión aplicada gracias al fluido circulante, tal como lo sugiere Boyle y col. (1997). Cambios en variables estructurales del biofilm, como pueden ser la porosidad y la densidad, van a afectar la transferencia de solutos y por ende la resistencia hidrodinámica, influyendo en el proceso de desprendimiento. Estos cambios en la viscoelasticidad del biofilm podrían explicar las grandes caídas de presión observadas en las cañerías en instalaciones industriales (Picologlou y col. 1980).

Dentro del proceso de biofouling, el desprendimiento de los microorganismos es crucial como estrategia para colonizar nuevos sitios; una vez que los microorganismos formando parte de los biofilms se desprenden pueden conducir a la transmisión de microorganismos patógenos y/o contaminantes ó a su dispersión hacia nuevos lugares (Vieira y col. 1993;

Walker y col. 1995). Por lo tanto, el estudio reológico de los biofilms provee información importante sobre la estabilidad mecánica de su estructura y en consecuencia cómo se verán afectados los procesos de desprendimiento (Stoodley y col. 1998). Como ya se ha mencionado, debido a la ubicuidad de los biofilms, el conocimiento de sus propiedades mecánicas sería de utilidad para preservar la eficiencia y eficacia de los equipos comprometidos (Pavlovsky y col. 2013). En el caso de que los biofilms se desarrollen en cañerías o equipos sometidos a un líquido circulante los microorganismos van a estar expuestos a tensiones y esfuerzos que van a variar tanto en amplitud como en frecuencia. A partir del estudio de las propiedades mecánicas podemos entender cómo las interacciones entre el alimento líquido y la viscoelasticidad de un biofilm pueden dar lugar al desprendimiento y difusión de sus componentes, los cuales pasarán a la fase líquida formando parte del fluido y esparciéndose a lo largo del sistema (Costerton y col. 1987; Marshall 1992). En la Figura 1.2 se esquematizan los sucesivos procesos de desprendimiento y compresión que puede sufrir un biofilm maduro, y que pone de manifiesto la importancia del estudio de la fuerza y estabilidad de los mismos.

La capacidad de los biofilms para deformarse en respuesta a la tensión mecánica aplicada puede ser una estrategia de defensa conservada para permitir la persistencia en superficies bajo diferentes condiciones de flujo (Houari y col. 2008). En el caso de Stoodley y col. (1998) encontraron que la viscoelasticidad le permite a los biofilms deformarse cuando son expuestos a una gama de tensiones y así resistir el desprendimiento debido a un aumento en la fuerza del fluido circulante. A pesar de esto las investigaciones sobre las propiedades mecánicas y / o cómo el ambiente influye en el desarrollo de los biofilms son escasas (Stoodley y col. 2002b). Esta falta de datos se debe a dos grandes razones, en primer lugar, sólo unos pocos grupos han reconocido la importancia y las implicancias de considerar a los biofilms como materiales, y en segundo lugar, debido a la complejidad de estudiar mecánicamente a los biofilms.

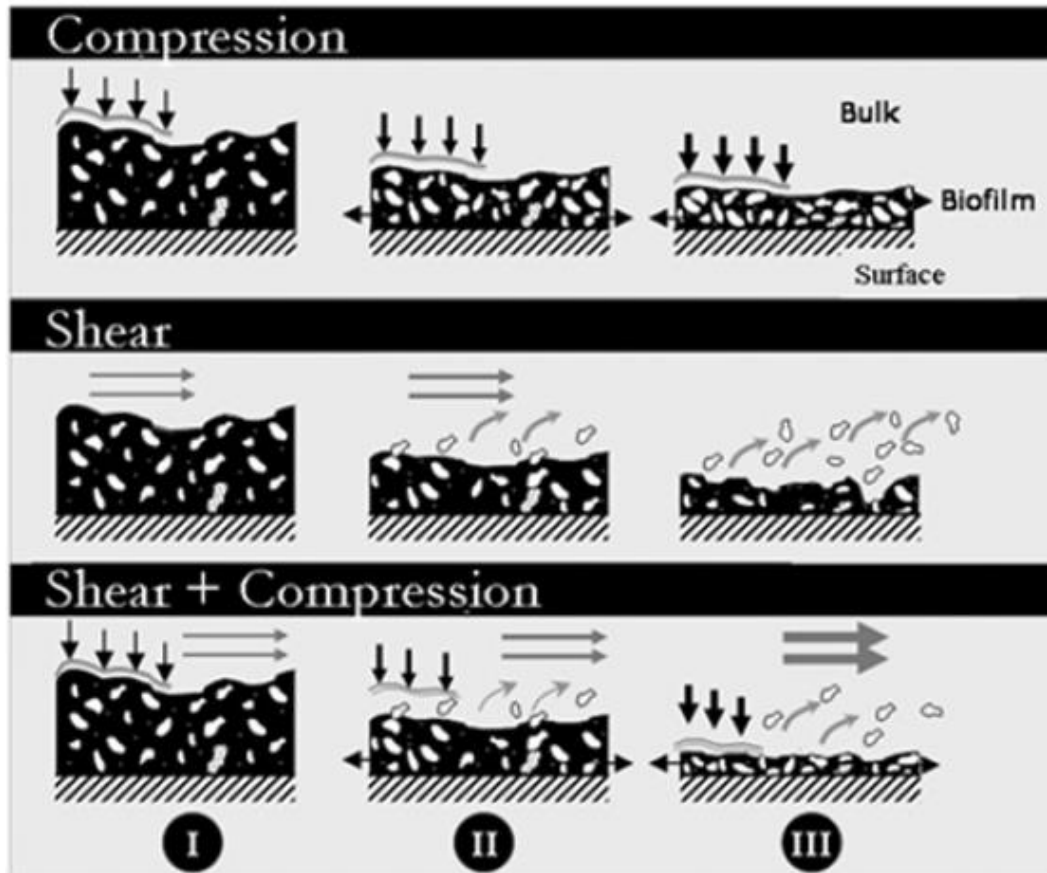


Figura 1.2. Representación esquemática de los conceptos de compresión y desprendimiento simultáneos en un biofilm. Extraído de Paul y col. (2012).

Los estudios reportados en la literatura en su mayoría implican la remoción del biofilm de la superficie sobre la cual se formaron y su posterior estudio en suspensión (Ohashi y Harada 1994). A pesar de que este enfoque puede proporcionar datos interesantes, no provee información directa del comportamiento de los biofilms *in situ* de manera de representar la forma intacta que adoptan.

Como ya se mencionó en los capítulos anteriores, la levaduras son capaces de adherirse y formar biofilms maduros en materiales y condiciones comúnmente encontradas en plantas procesadoras de jugos de fruta. Además, una de las especies de levaduras encontradas en el sistema de UF, *Candida krusei*, ya fue citada como colonizadora de AI y capaz de formar biofilms bajo distintas condiciones hidrodinámicas (laminar, transicional y turbulento) en etapas previas y posteriores a la clarificación del jugo (Brugnoni y col. 2011a; Brugnoni y

col. 2011b; Brugnoli y col. 2012). De la revisión bibliográfica hecha hasta el momento, no hemos encontrado datos reológicos de biofilms de levaduras y de la forma en que se ven influidos por cambios en el entorno en el que se desarrollan. Dos de los estudios que caracterizan *in situ* la reología de biofilms de levaduras aisladas de industrias alimentarias es de nuestra autoría (Brugnoli y col. 2014; Tarifa y col. 2017).

OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades viscoelásticas lineales y no lineales de biofilms multi-especie de levaduras directamente sobre las superficies donde se desarrollaron en condiciones hidrodinámicas variables.

Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades viscoelásticas de biofilms mixtos de levaduras (*C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefir* y *R. mucilaginosa*) desarrollados bajo condiciones de flujo estático y turbulento.
- Estudiar el efecto de la concentración (6 y 12 °Brix) y el tipo de jugo de fruta (manzana y pera) sobre la formación, composición y reología de biofilms mixtos de levaduras.
- Estudiar las variaciones en la composición, arquitectura y espesor de la comunidad resultante en función de las condiciones de cultivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de las propiedades viscoelásticas se realizaron ensayos con cultivos mixtos de *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr* y *Rhodotorula mucilaginosa*, todas ellas aisladas de membranas de UF como se detalla en el Capítulo 1 (“Aislamiento, caracterización fisicoquímica y adhesión de microorganismos”).

Para los ensayos, un vial de cada cepa fue re-suspendido en caldo YGC y cultivado durante 48 horas a 25 ± 1 °C bajo agitación suave (50 rpm) con un agitador orbital. Cada cultivo fue centrifugado a $2000 \times g$ por 5 minutos (Labofuge 200, Kendro, Alemania) y posteriormente lavadas dos veces con PBS. El pellet resultante de cada especie fue re-suspendido en jugo hasta alcanzar una DO_{550} de 0,125 ($\approx 10^6$ células/ml) medida con un espectrofotómetro de luz visible. Como matriz líquida se utilizaron dos tipos de jugo: manzana y pera, a dos concentraciones de azúcares diferentes: 6 y 12 °Brix. Para la preparación del inóculo final con el que se realizaron las experiencias se mezclaron cantidades iguales de cada una de las suspensiones celulares ajustadas (*Candida tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* y *Rhodotorula mucilaginosa*) y se dejaron 24 horas en contacto con las superficies. A partir de dicho momento se realizaron recambios de jugo cada 72 horas de manera de renovar los nutrientes.

2.1. Matriz líquida de estudio (medio de cultivo)

De manera de representar lo más cercanamente posible lo que sucede en las industrias jugueras se utilizaron jugos de manzana y pera, ambos cedidos por una empresa productora y exportadora de jugo concentrado radicada en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Argentina).

La composición de los jugos depende de varios factores entre ellos la variedad y desarrollo de los frutales, las condiciones climáticas de crecimiento, como así también de los procesos de fabricación y almacenamiento de los mismos (Lee y Mattick 1989; Hicks 1990). Se partió de batches de jugo concentrado y se realizaron las diluciones correspondientes (siguiendo la fórmula descrita en el Capítulo 1 “Composición del jugo de manzana”¹) de manera de obtener tanto para los jugos de manzana como los de pera concentraciones de 6 y 12 °Brix. De manera que sea más sencilla su nomenclatura a lo largo del texto se los

¹ Ver página 25.

denominará de ahora en adelante $M_{6^{\circ}Bx}$, $M_{12^{\circ}Bx}$, $P_{6^{\circ}B}$ y $P_{12^{\circ}B}$, respectivamente. Tal como se describe en el Capítulo 1 cada una de las soluciones de jugo fueron previamente esterilizadas por microfiltración utilizando membranas de un tamaño de poro de 0,45 μm (Metricel[®]Grid, GelmanSciences, MI, EE.UU.).

Analizando la composición, tanto los jugos de pera como los de manzana, poseen constituciones muy similares en cuanto a los componentes principales como los son carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos por lo tanto la detección de diferencias basadas en estos compuestos puede resultar muy difícil. De acuerdo a lo citado en la bibliografía sólo los perfiles fenólicos podrían presentar ciertas diferencias entre ambos tipos de jugos (Spanos y Wrolstad 1992; Thavarajah y Low 2006). Se pueden mencionar como componentes principales de ambos jugos a los carbohidratos, ácidos, compuestos nitrogenados, polifenoles, minerales y vitaminas (Spanos y Wrolstad 1990; Lozano 2006).

2.2. Reología: Formación de biofilms bajo condiciones estáticas

Para ensayar el efecto que podría tener una condición de flujo estacionaria (E) sobre la formación y desarrollo de biofilms se utilizó un sistema conformado por tres vasos de precipitado de vidrio con una capacidad de 500 ml, cada uno con un disco de AI de tipo AISI 304 (de calidad alimentaria) de 50 mm diámetro y 0,5 mm espesor. Cada uno de los sistemas vaso de precipitado-disco fue previamente lavado por 15 minutos con una solución de detergente neutro al 2% (Extran MA 02 neutral, Merck) y enjuagados con agua destilada a 50 °C. Posteriormente se procedió esterilizar los sistemas durante 15 minutos a 120°C.

Para permitir la adhesión de los microorganismos, los sistemas (vaso de precipitado + discos de AI) fueron llenados con 500 ml de la suspensión mixta formada por las cuatro especies de levaduras. Los recambios de jugo se realizaron cada 72 horas de manera de renovar los nutrientes. Los sistemas fueron mantenidos a una temperatura de 20 ± 1 °C.

Al cabo de cuatro semanas los discos fueron removidos del sistema para ser analizados por microscopia de CLSM (Anexo 1 “Técnicas microscópicas”) además de la medición reológica. También se realizaron análisis de la composición microbiana resultante (como se detallará en la Sección 2.4). Cada ensayo fue realizado por triplicado.

2.3. Reología: Formación de biofilms bajo condiciones dinámicas

Equipo experimental

Tal como se mencionó en el Capítulo 1, durante los ciclos de producción las membranas de UF operan bajo flujo turbulento. Para ver el efecto de dichas condiciones sobre la adhesión y formación de biofilms se utilizó un sistema de disco giratorio (SDG) descrito por Brugnoli y col. (2011b). Brevemente, el mismo está compuesto por un disco de acrílico de 0,2 m de diámetro y 5 mm de espesor, en donde se adhieren las superficies a ensayar, y el cual rota en un contenedor de acero inoxidable de 30 cm de diámetro y 19 cm de altura. El SDG utiliza un motor Boeco Modelo OSD-20 (Boeckel Co., Hamburg, Alemania) con controlador digital de velocidad para determinar la velocidad a la cual el jugo fluirá en el sistema (ver Figura 2.1).

La superficie sobre la cual se hicieron crecer los biofilms y se determinaron las propiedades mecánicas fueron discos de acero inoxidable AISI 304 de las mismas características de los utilizados en la Sección 2.6² del Capítulo 1. Los mismos fueron pegados al disco de acrílico utilizando un pegamento adhesivo de contacto (POXIPOL™, Akapol, Argentina).

La dinámica del fluido a lo largo de la superficie del SDG fue descrito por Levich y Technica (1962). El fluido fue caracterizado con el número de Reynolds (Re) definido como $\rho \omega r^2 \mu^{-1}$, donde ρ es la densidad del fluido (en este caso jugo de manzana, 1,020 kg m⁻³), ω es la velocidad angular (rad s⁻¹), r es el radio del disco (m), y μ es la viscosidad del fluido (para el jugo de manzana: 1,24 x 10⁻³ Pa s). Este parámetro representa la relación de flujo inercial a viscoso, en el caso de flujos turbulentos $Re > 200,000$ el shear stress (τ_{turb}), de acuerdo a Visser (1973) es $\tau_{turb} = 0.534 \rho r^{8/5} \mu^{1/5} \omega^{9/5}$. La velocidad rotacional fue ajustada para obtener un Re de 210,000 (shear stress: 204,5 N m⁻²).

Desarrollo del biofilm

Para permitir la adhesión de las levaduras y el posterior desarrollo del biofilm, el contenedor de AI fue llenado con la suspensión celular mixta ajustada de las cuatro especies de levaduras. El SDG permaneció en funcionamiento durante 8 horas diarias a lo largo de las cuatro semanas de duración del ensayo. Al igual que lo mencionado en la Sección 2.2 (“Formación de biofilms bajo condiciones estáticas”), a lo largo de los ensayos se realizaron recambios del jugo de manzana cada 72 horas, a fin de proveer los nutrientes

² Ver página 28.

faltantes por el consumo de los microorganismos. Los ensayos se realizaron a una temperatura de 20 ± 1 °C. Finalizado los ensayos, los discos fueron cuidadosamente removidos del sistema para ser analizados por microscopía de CLSM, además de la medición reológica y el análisis de la composición microbiana resultante (lo cual se detallará en la Sección 2.4). Cada ensayo se realizó por triplicado.

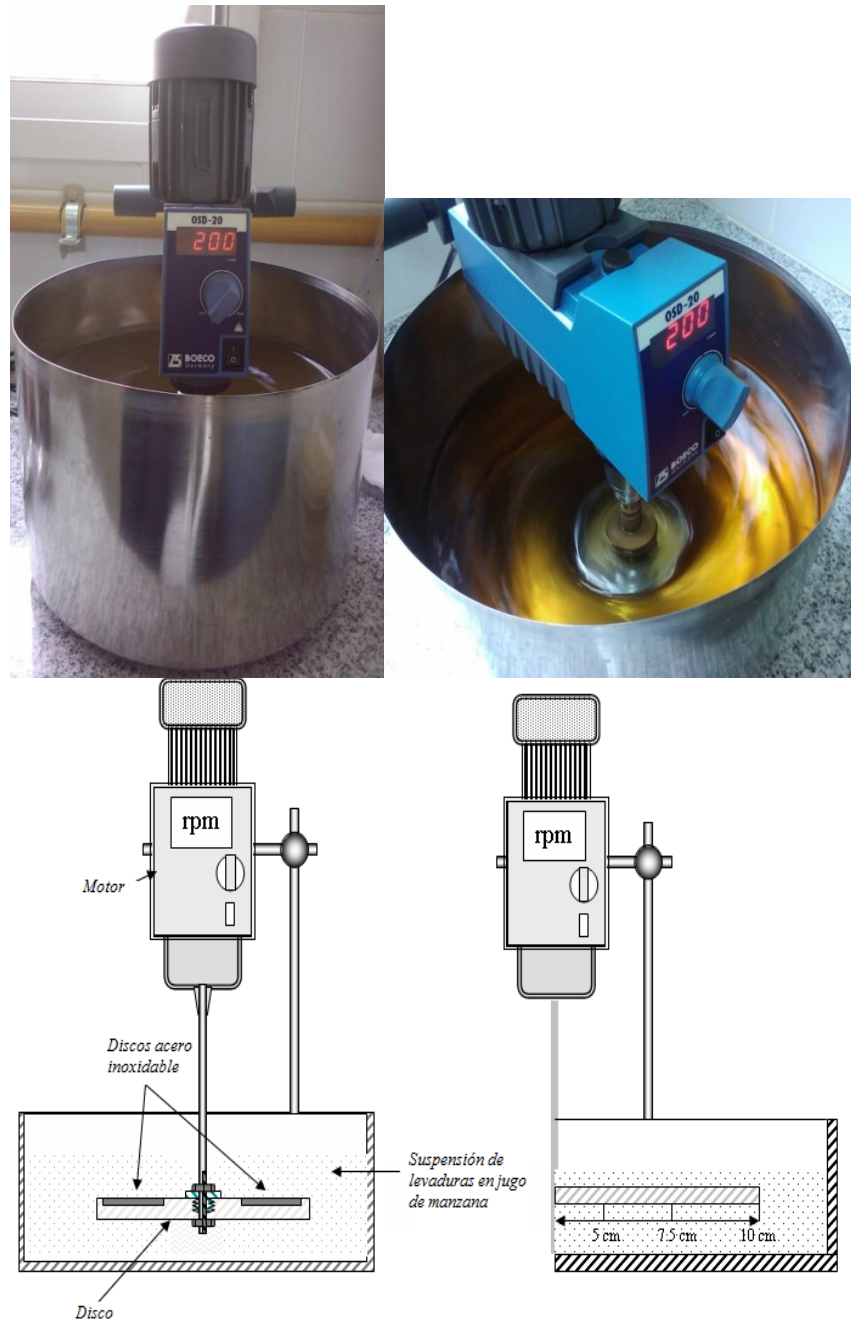


Figura 2.1. Sistema de disco giratorio utilizado para el ensayo de flujo dinámico (Brugnoni y col. 2011b)

2.4 Análisis microbiológico

Tanto en los ensayos mencionados en la Sección 2.2 como en la Sección 2.3, una vez finalizados los mismos (con los diferentes tipos de jugos y las dos concentraciones), se analizaron los recuentos y la composición de la comunidad de levaduras resultante.

Para este análisis se utilizaron segmentos de AI de 1 cm x 2 cm, los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones de cultivo que las mencionadas para los discos más grandes destinados a las mediciones reológicas. Las superficies de AI fueron removidas de los correspondientes sistemas, y los biofilms fueron raspados con una espátula estéril de AI. El biofilm resultante fue colocado en tubos de ensayo con perlas de vidrio y agitados a máxima velocidad durante 3 minutos de manera de disgregar los acúmulos de microorganismos desprendidos (Lindsay y Von Holy 1997).

Las correspondientes diluciones seriadas se utilizaron para realizar los recuentos en el agar cromogénico CHROMagar *Candida* (CHROMagar Microbiology, Paris, Francia) por técnica de agotamiento en superficie (volumen sembrado 0,2 ml). Cada placa fue incubada durante 48 horas a 25 °C.

2.5 Mediciones reológicas

Las propiedades viscoelásticas de los biofilms fueron determinadas mediante ensayos dinámico-oscilatorios en un reómetro Paar Physica MCR301 (Anton Paar GmbH, Austria) de esfuerzo y deformación controlados, usando una geometría de platos paralelos (50 mm de diámetro). La respuesta de los biofilms se realizó a esfuerzos de deformación suficientemente bajos para asegurar tener determinaciones en la zona lineal elástica. La temperatura de medición del plato inferior fue de 25 °C en concordancia con la temperatura de formación de los biofilms.

Los discos de AI con desarrollo de biofilm tanto los desarrollados de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.2 como en la Sección 2.3 fueron colocados en el reómetro y asegurados al plato inferior del mismo mediante un anillo especial diseñado *ad hoc*. El sistema completo se muestra en la Figura 2.2.

Para cada medición se utilizó un nuevo sistema disco+biofilm sujeto al plato inferior. En cada caso el plato superior descendió hacia la muestra hasta que la fuerza normal fue de aproximadamente 1 N y se dejó descansar 5 minutos para que se estabilizara la muestra.

Los análisis reológicos se realizaron en un trabajo interdisciplinario con el Dr. Diego Genovese (Investigador Independiente perteneciente a la Planta Piloto de Ingeniería Química, CONICET-UNS).

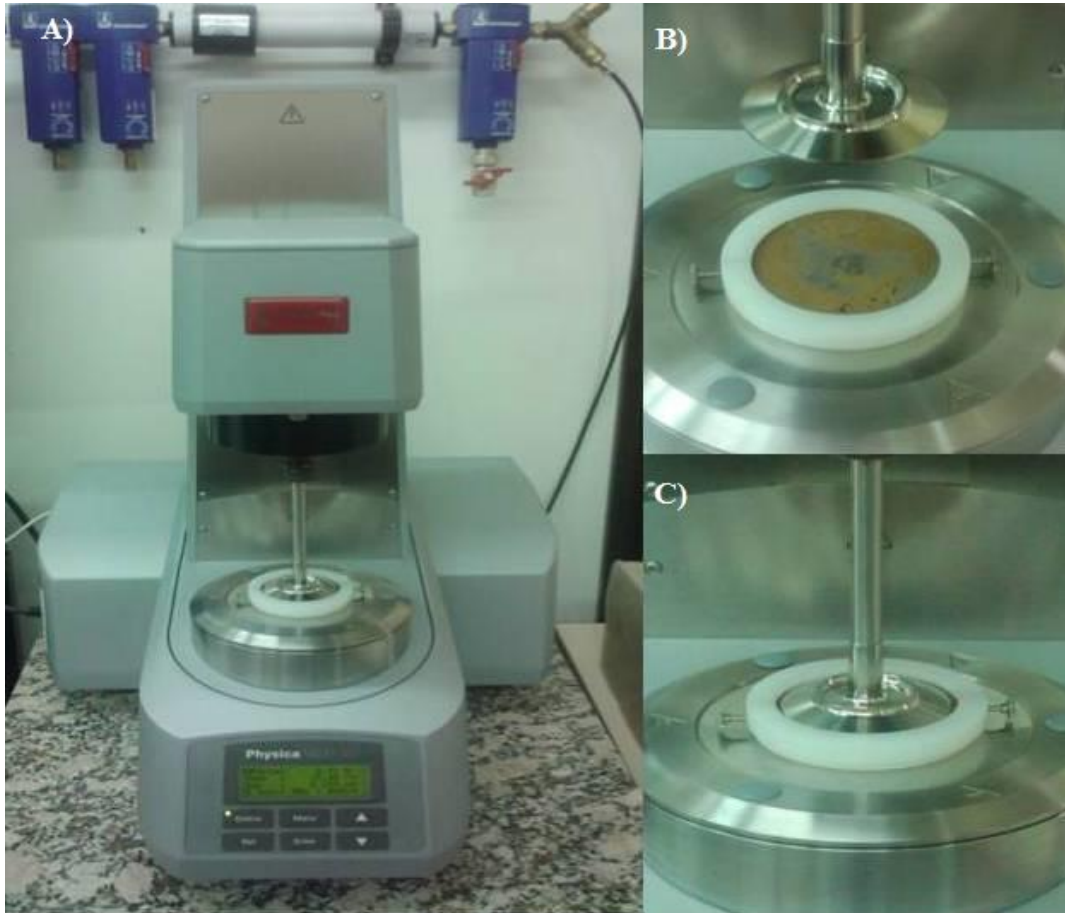


Figura 2.2. A) Vista del reómetro Paar Physica modelo MCR 301 utilizando una geometría de platos paralelos donde se ve un disco de acero inoxidable unido al plato inferior por medio de un anillo especial diseñado *ad hoc*. B) Vista superior del anillo especial diseñado *ad hoc* con una muestra. C) Primer plano del anillo sujetando una muestra en el plato inferior del reómetro.

Se midieron los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la frecuencia angular (ω) entre 0,1 a 100 rad/s para una velocidad de deformación constante ($\dot{\gamma} = 5 \times 10^{-2} \%$). También se midieron el módulo complejo $G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$, y la tangente de pérdida ($\tan \delta = G''/G'$). El barrido de frecuencia es válido cuando se realiza dentro del rango viscoelástico lineal (RVL), el cual es la mínima deformación aplicada que no altera la microestructura de la muestra. Una de las formas de determinar el RVL es a través de un

barrido de frecuencia para ver el rango en donde G' y G'' son aproximadamente constantes. Sin embargo con este procedimiento se destruye la estructura de la muestra.

Las mediciones se hicieron por triplicado, tomando cada réplica como el promedio de tres discos. En cada caso las muestras fueron transportadas de manera tal de mantener la humedad, reduciendo las perturbaciones y de esa manera obtener información más real de la estructura.

2.6. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de tres factores para analizar propiedades estructurales y reológicas, con dos niveles por factor y tres repeticiones por nivel. Los factores fueron el tipo de flujo (estático o turbulento), el tipo de jugo (manzana o pera), y el tercer factor fue la concentración (6 ó 12 ° Brix). Los resultados se analizaron estadísticamente con el programa Design Expert 7.0 Software, con un nivel de significación del 5%.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis microbiológico

Al cabo de las cuatro semanas del ensayo se observó una completa cobertura de las superficies tanto bajo condiciones turbulentas como estáticas (Figura 3.1). A su vez se encontraron diferencias (con respecto al inóculo inicial del que se partió) tanto en la composición como en el recuento de las especies en los biofilms formados sobre las superficies de AI.

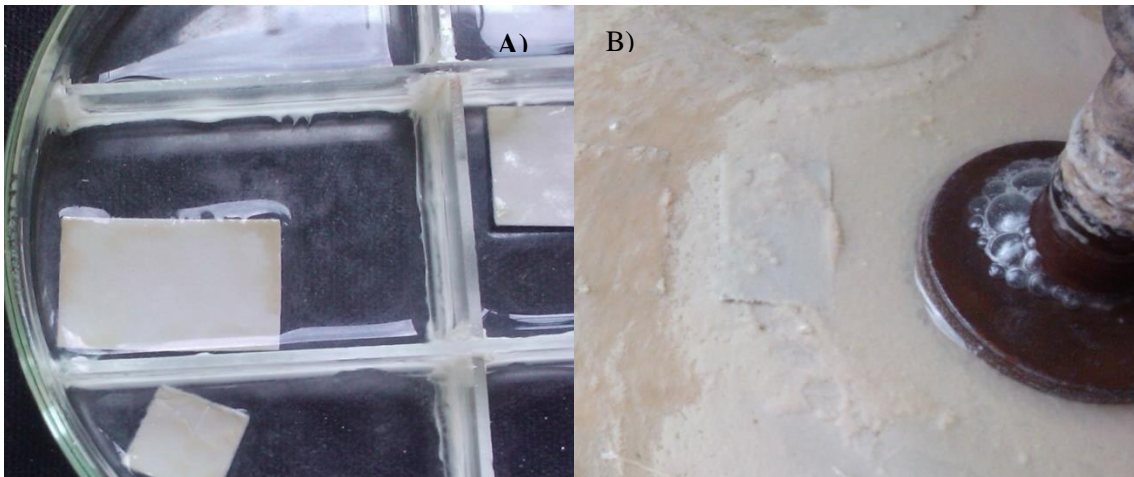


Figura 3.1. Imágenes de las superficies de acero inoxidable con crecimiento luego de cuatro semanas de incubación a 20°C y jugo de manzana de 12°C. A) Condición estática, B) Flujo turbulento en donde se ve la superficie pegada al SDG.

Utilizando CHROM agar *Candida* como medio para el recuento y diferenciación, se observó que la comunidad en ambos tipos de jugos, sin importar la concentración de los mismos, estuvo representada por *Candida krusei*, *C. kefyr* y *C. tropicalis*, mientras que *Rhodotorula mucilaginosa* no fue recuperada de ninguna de las situaciones ensayadas. Analizando las condiciones de flujo turbulento, los recuentos de células viables aumentaron al menos en 0,50 unidades logarítmicas en comparación con las condiciones estáticas para *Candida tropicalis* en jugo de pera. En los restantes casos los aumentos oscilaron entre 0,60 hasta 0,79 unidades logarítmicas de diferencia. Estos resultados pueden observarse en la Tabla 3.1, en donde se muestran los aumentos en biomasa entre ambos tipos de flujos.

Tabla 3.1. Incremento del número de células viables expresado como Log_{10} entre las condiciones de flujo turbulento y estático. Los resultados están expresados como media \pm DE.

Especie	$M_{6^\circ B}$	$M_{12^\circ B}$	$P_{6^\circ B}$	$P_{12^\circ B}$
<i>Candida krusei</i>	0,62 \pm 0,05	0,64 \pm 0,06	0,59 \pm 0,08	0,56 \pm 0,30
<i>Candida tropicalis</i>	0,60 \pm 0,19	0,76 \pm 0,15	0,52 \pm 0,14	0,79 \pm 0,16
<i>Candida kefyr</i>	0,61 \pm 0,07	0,73 \pm 0,14	0,63 \pm 0,10	0,69 \pm 0,18

Por otro lado se utilizaron las observaciones por CLSM para la estimación de los espesores de los biofilms resultantes. El espesor de los mismos fue elegido como una de las respuestas experimentales a medir, los cuales variaron entre 38 μm para $P_{6^\circ Bx}$ – estático y 148 μm para $P_{12^\circ Bx}$ – turbulento. En la Tabla 3.2 se muestran los espesores resultantes en las condiciones ensayadas. Si evaluamos primero el efecto del tipo de jugo (J) luego de cuatro semanas de exposición, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el espesor de los biofilms; mientras que analizando el efecto del tipo de flujo (F), la concentración del jugo (C) y la interacción entre F*J y F*C se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al espesor.

Tabla 3.2. Espesor de los biofilms en función del tipo de jugo, concentraciones y flujos ensayados. Los mismos están expresados en μm (Media \pm DE)

Flujo	Muestra	Espesor (μm)
Estático	$M_{6^\circ B}$	47 \pm 6
	$M_{12^\circ B}$	63 \pm 10
	$P_{6^\circ B}$	38 \pm 11
	$P_{12^\circ B}$	52 \pm 2
Turbulento	$M_{6^\circ B}$	53 \pm 4
	$M_{12^\circ B}$	133 \pm 10
	$P_{6^\circ B}$	72 \pm 11
	$P_{12^\circ B}$	148 \pm 17

Como puede observarse los espesores son mayores en aquellos biofilms desarrollados bajo flujo turbulento y a mayores concentraciones de jugo. Los datos mostraron una distribución normal sin *outliers*. Los análisis de regresión lineal llevaron a un modelo lineal como respuesta más adecuada a los datos analizados. Los resultados de Anova mostraron que el modelo era significativo, a su vez se procedió al cálculo R^2 , el cual también fue predicho. El modelo que se predijo para el espesor de los biofilms en términos de los factores analizados es el siguiente:

$$\text{Espesor } (\mu\text{m}) = 75,83 + 26,00 \cdot F + 1,92 \cdot J + 23,33 \cdot C + 6,92 \cdot F \cdot J + 15,83 \cdot F \cdot C \quad (\text{Ec. 1})$$

$$(R^2 = 0,965, R^2_{\text{adj}} = 0,956, R^2_{\text{pred}} = 0,938)$$

La influencia del flujo de un líquido en el espesor de un biofilm se puede explicar considerando los factores que influyen en la estructura del mismo: velocidad del flujo y nutrientes (Bott 1995). La velocidad del flujo determina el esfuerzo de corte debido a la fuerza hidrodinámica del líquido, y por ende las características de transferencia de masa en el sistema (Stoodley y col. 1998). La transferencia de masa puede describirse como la eficiencia de los sólidos suspendidos (nutrientes) para ser incorporados desde la fase líquida (solución que fluye) a la fase adherida representada por el biofilms.

A través de las imágenes de los biofilms obtenidas por CLSM pudimos observar la estructura tridimensional a lo largo de las condiciones testeadas. En primer lugar vemos que los biofilms formados una vez teñidos con FDA mostraron fluorescencia verde, con lo cual podemos asegurar que las células se encontraban metabólicamente activas. Por otro lado a partir de las Figuras 3.2 A a D (biofilms formados en condiciones estáticas) y la Figura 3.3 A a D (biofilms formados bajo condiciones de flujo turbulento) se observa la capacidad de las especies de formar biofilms robustos dentro de las condiciones ensayadas. Es interesante remarcar lo citado por Stoodley y col. (1998) en donde define el grosor de los biofilms como la distancia entre la superficie y los picos más altos formados por las células, considerando los canales que rodean las agrupaciones celulares como parte integral del biofilm. A su vez se puede observar la presencia de canales a medida que los biofilms se vuelven más robustos.

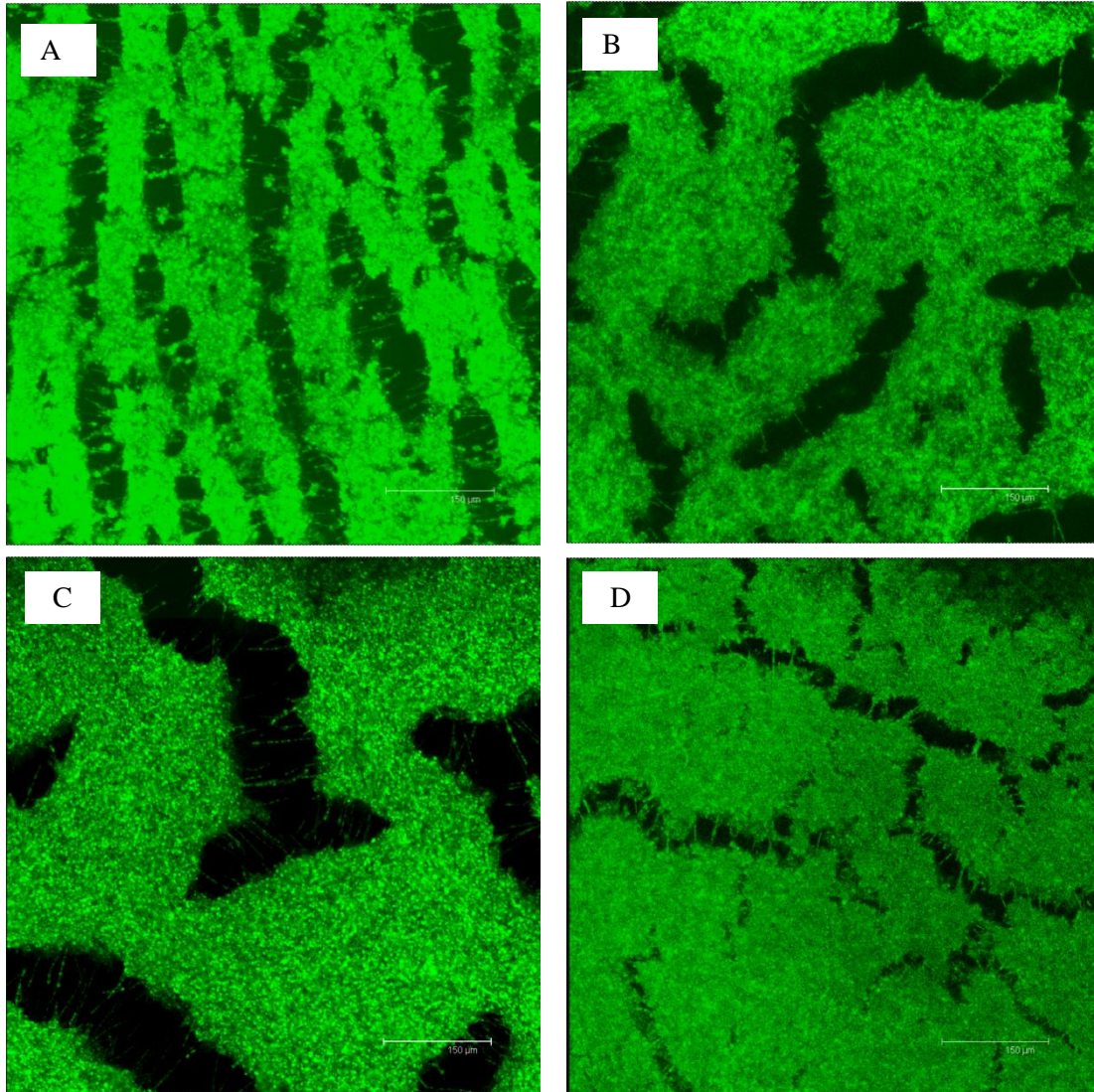


Figura 3.2. Imágenes obtenidas por CLSM de los biofilms formados bajo condiciones estáticas. A y B corresponden a jugo de manzana; C y D corresponden a jugo de pera. Primera fila: 6°Brix, segunda fila 12°Brix

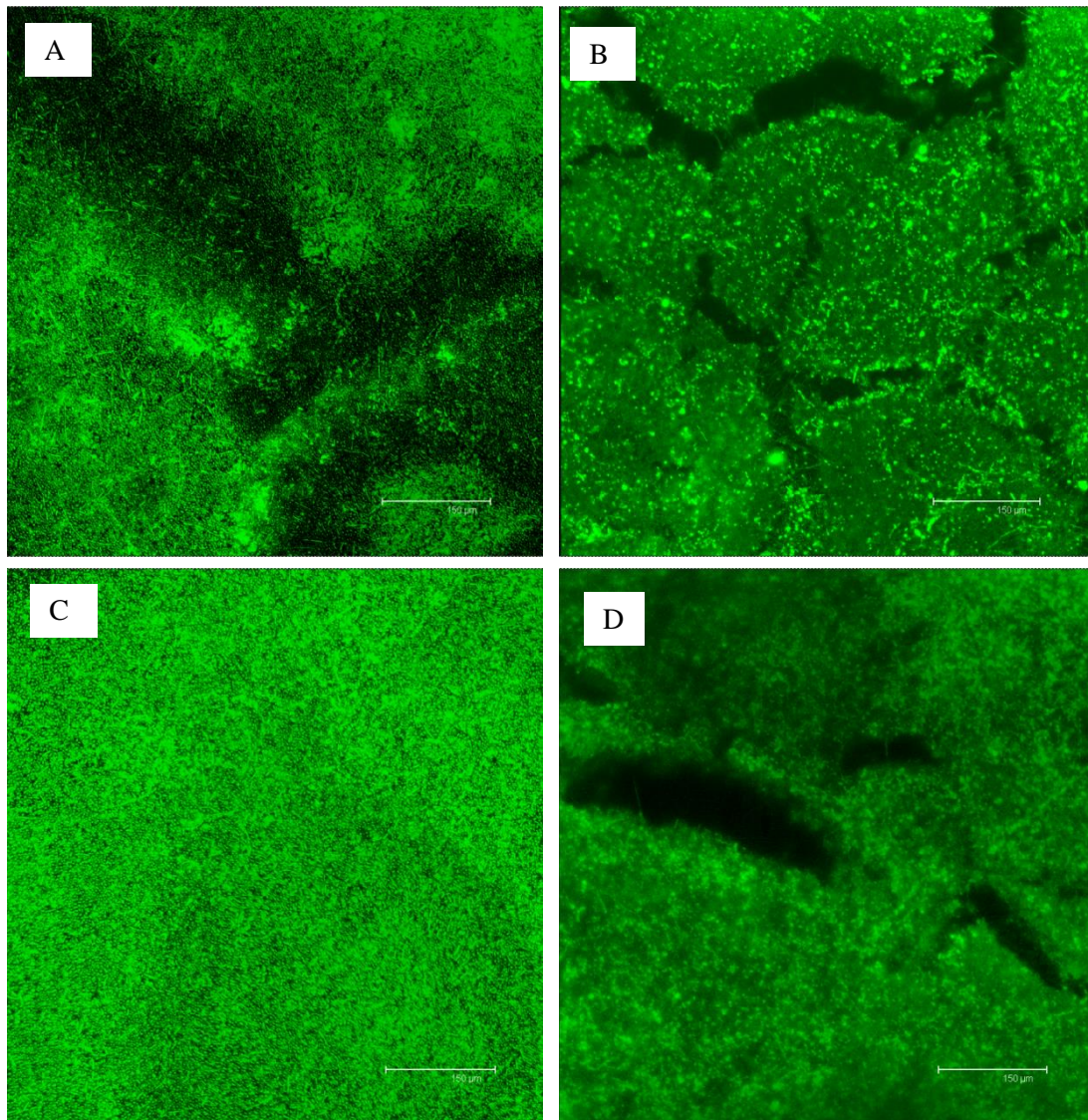
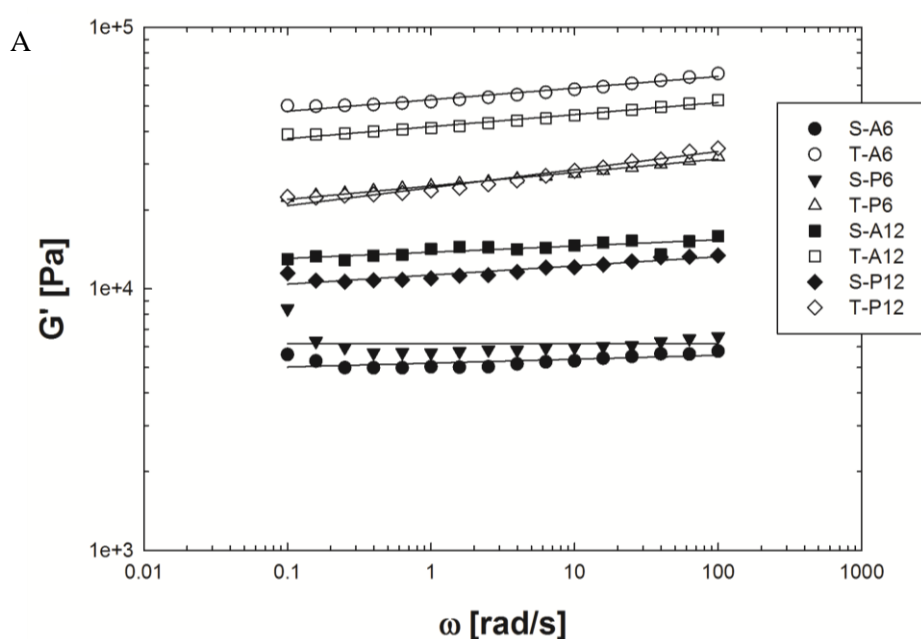


Figura 3.3. Imágenes obtenidas por CLSM de los biofilms formados bajo condiciones turbulentas. A y B corresponden a jugo de manzana; C y D corresponden a jugo de pera. Primera fila: 6°Brix, segunda fila. 12°Brix

3.2 Mediciones reológicas

En aquellos biofilms que se desarrollan bajo una condición de flujo como puede ser un alimento líquido circulando por una cañería/membrana, la deformación y el desprendimiento van a depender de las condiciones hidrodinámicas a las que estén expuestos (la tensión aplicada por el fluido en movimiento) y de las propiedades mecánicas de los propios biofilms. Con respecto a esto último, en estudios previos se ha postulado que los biofilms presentan una naturaleza viscoelástica (Stoodley y col. 2002a; Towler y col. 2003; Houari y col. 2008; Pavlovsky y col. 2013).

Tal como se mencionó, todas las superficies de AI analizadas mostraron una progresión completa en cuanto a su cobertura. Las propiedades viscoelásticas de los biofilms fueron determinadas mediante ensayos dinámicos oscilatorios. Se midieron los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la frecuencia de barrido. En la Figura 3.4 A se muestran los valores promedio obtenidos de G' . De manera de mantener la claridad en los datos graficados sólo se muestran dichos valores obviándose los de G'' . En todos los casos G' fue mayor que G'' a lo largo de las frecuencias estudiadas, confirmando que los biofilms se comportan como materiales viscoelásticos. A su vez, G' , pero no G'' , exhibió un ligero aumento, comportamiento típico de materiales con una estructura de tipo gel. Resultados similares se encontraron en otros trabajos (Houari y col. 2008; Pavlovsky y col. 2013) en donde se le atribuyó esta característica a la presencia de una matriz de EPS con las propiedades reológicas de un gel. A su vez G' presentó curvas con valores mayores para aquellos biofilms formados bajo condiciones de flujo turbulento en comparación con los obtenidos para las condiciones de cultivo estáticas. También se calculó el promedio de los valores obtenidos para el módulo complejo (G^*) en donde las curvas, si bien no se mostrarán, presentaron el mismo comportamiento que el observado para G' . Por otro lado, el promedio de la tangente de pérdida ($\tan \delta$) se graficó en función de la frecuencia angular, resultados que se muestran en la Figura 3.4 B, los cuales fueron bajos ($< 0,25$) e independientes de la frecuencia, hecho que indicaría un comportamiento típico de materiales con una estructura de tipo gel como ya se mencionó.



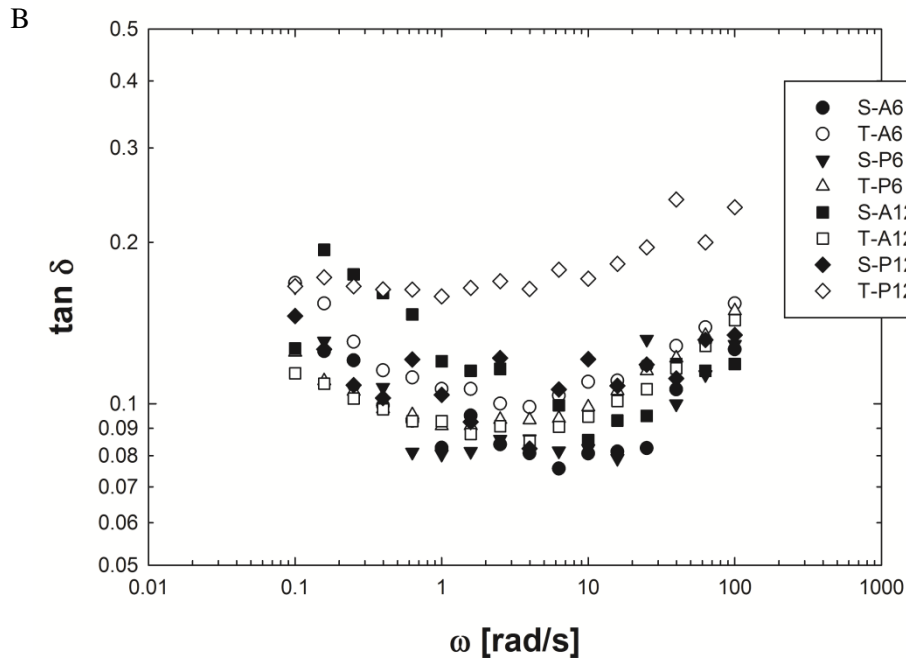


Figura 3.4. Propiedades reológicas de los biofilms de levaduras desarrollados en jugo de manzana y pera de 6 y 12 °Brix (A_6 , P_6 , A_{12} , P_{12}) tanto bajo condiciones estáticas (S, representado por los símbolos blancos) como turbulentas (T, representado por los símbolos negros). A) Módulo elástico (G') vs la frecuencia angular (ω) (las líneas son las curvas ajustadas de acuerdo a la Ec. 1). B) Tangente de pérdida ($\tan \delta$) en función de la frecuencia angular (ω).

Los datos experimentales originales (no promediados) de G' vs ω fueron ajustados con una función tipo ley de la potencia:

$$G' = G'_0 \cdot \omega^n \quad (\text{Ec. 2})$$

En donde G'_0 predice los valores de G' cuando $\omega = 1$ rad/seg, y n muestra cómo G' cambia con ω (pendiente de la curva). En la Figura 3.4 A se muestran los valores de G' vs ω ajustados de acuerdo a la Ec. 2; los valores de G'_0 variaron entre 5,11 a 52,96 kPa mientras que los de n variaron entre 0,0153 y 0,0613, por otro lado G^* a un $\omega = 1$ rad/seg varió entre 5,32 y 58,25 kPa. En el caso de $\tan \delta$ a $\omega = 1$ rad/s varió en un rango de 0,0819 a 0,1477. Los valores de los parámetros mencionados anteriormente se muestran en la Tabla 3.3.

Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el efecto del tipo de flujo (estático-turbulento) sobre G'_0 , n , y G^* , siendo todos ellos mayores en el caso del flujo turbulento. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en el efecto de dichos factores sobre $\tan \delta$. Los resultados de las transformaciones de Box Cox indican que tanto G'_0 como G^* necesitan una transformación de tipo logarítmica para cumplir

con los supuestos para realizar un Anova, no así n . Los datos resultantes muestran una distribución normal sin *outliers*. Los análisis de regresión sugieren que un modelo lineal es el más apropiado de acuerdo a las respuestas obtenidas de los ensayos. A partir de los análisis de Anova se desprende que el modelo es significativo y que el R^2 se encuentra dentro de los valores razonables.

La relación señal / ruido fue adecuada para los casos de G'_0 y G^* , pero no para n , por lo que este último fue descartado del modelo. El modelo resultante, obtenido para G'_0 y G^* en función de un factor F codificado como -1 para condición estática, y $+1$ para el flujo turbulento, queda expresado como:

$$\text{Ln } G'_0(\text{Pa}) = 9,58 + 0,75 \cdot F \quad (R^2 = 0,563, R^2_{\text{adj}} = 0,543, R^2_{\text{pred}} = 0,479) \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\text{Ln } G^*(\text{Pa}) = 9,66 + 0,79 \cdot F \quad (R^2 = 0,576, R^2_{\text{adj}} = 0,557, R^2_{\text{pred}} = 0,495) \quad (\text{Ec. 4})$$

Los valores predichos para G'_0 son 6840 Pa para la condición estática y 30940 Pa para el caso de flujo turbulento. En el caso de G^* los valores predichos fueron de 7150 Pa y 34540, respectivamente.

Como ya se mencionó se puede observar que el crecimiento de biofilms bajo condiciones de flujo turbulento se asemeja más al comportamiento visto para materiales de tipo sólido. Esto está en concordancia con lo descrito por otros autores (Shaw y col. 2004; Flemming 2011) que plantean un aumento en la cohesión de los biofilms ante esfuerzos de corte crecientes.

Tabla 3.3. Propiedades reológicas de los biofilms en función del medio en el cual fueron cultivados y de las condiciones de flujo. Los resultados están expresados como media \pm DE.

Flujo	Muestra	G'_0 (kPa)	$n \times 100$	G^* (kPa)	$\tan \delta \times 100$
Estático	$M_{6^\circ B}$	$5,11 \pm 2,66$	$2,83 \pm 3,06$	$5,32 \pm 2,55$	$8,19 \pm 0,44$
	$M_{12^\circ B}$	$13,78 \pm 11,11$	$1,53 \pm 2,76$	$14,72 \pm 12,59$	$10,28 \pm 3,39$
	$P_{6^\circ B}$	$5,86 \pm 4,26$	$2,90 \pm 2,79$	$6,01 \pm 4,10$	$10,05 \pm 4,35$
	$P_{12^\circ B}$	$11,19 \pm 5,23$	$2,55 \pm 4,57$	$12,19 \pm 6,08$	$12,61 \pm 3,77$
Turbulento	$M_{6^\circ B}$	$52,96 \pm 16,89$	$3,91 \pm 2,47$	$58,25 \pm 20,28$	$10,77 \pm 2,80$
	$M_{12^\circ B}$	$41,78 \pm 35,29$	$3,83 \pm 1,18$	$46,18 \pm 40,20$	$8,70 \pm 1,38$
	$P_{6^\circ B}$	$24,77 \pm 11,91$	$5,39 \pm 1,59$	$27,69 \pm 13,01$	$10,12 \pm 1,65$
	$P_{12^\circ B}$	$24,47 \pm 8,12$	$6,13 \pm 2,12$	$28,75 \pm 10,79$	$14,77 \pm 9,88$

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se estableció el efecto de las modificaciones en las condiciones de flujo, en el tipo y en la concentración de jugo, sobre la arquitectura, espesor y propiedades reológicas de biofilms mixtos de levaduras.

Analizando tanto el jugo de pera como el de manzana a 6 y 12 °Brix la comunidad estuvo dominada por *Candida krusei*, *C. kefyr* y *C. tropicalis*, mientras que *Rhodotorula mucilaginosa* no se recuperó del sistema. Si bien los biofilms aumentan su biomasa con el tiempo, no todos los miembros del mismo lo hacen activamente (Lappin-Scott y col. 1992).

Como ya fue descrito en los capítulos anteriores las levaduras poseen un gran potencial para adherirse y establecer biofilms a lo largo de los distintos puntos de producción de jugo.

Como ya se ha mencionado las especies pertenecientes al género *Candida* pueden adoptar tres morfologías diferentes de acuerdo a la especie, las cuales son: blastosporas (forma unicelular de levadura), pseudohifas e hifas. Más aún, algunas especies son capaces de intercambiar dichas formas de acuerdo a las condiciones impuestas por el medio, lo cual se supone que es utilizado como una estrategia invasiva.

Candida krusei es un organismos polimórfico capaz de crecer en forma de pseudohifas o blastosporas y es una de las especies frecuentemente encontradas en estos sistemas, tal como pudo verse en el Capítulo 1 y de acuerdo a lo citado por (Brugnoni y col. 2007), lo cual estaría evidenciando una ventaja adaptativa frente al resto de las especies. *Candida tropicalis* produce blastosporas y pseudohifas y de acuerdo a algunos reportes, también hifas (Thompson y col. 2011). Se ha sugerido que la presencia de estas formas de crecimiento puede tener importancia en la integridad estructural de biofilms multicapa (Baillie y Douglas 1999; Paramonova y col. 2009). Por el contrario, *C. kefyr* no es una especie polimórfica, creciendo sólo bajo la forma de blastosporas.

Aquellas células formando parte de hifas y/o pseudohifas contienen al menos tres veces más quitina que la formas levaduriformes (Braun y Calderone 1978; Chaffin y col. 1998). La quitina es un material hidrofóbico que se ha demostrado que aumenta la resistencia mecánica y la flexión de los sustitutos óseos (Chen y col. 2005). Una mayor cantidad de quitina, debido a la presencia de hifas y/o pseudohifas en un biofilm, podría ser responsable de una mayor resistencia a la compresión. Precisamente, la resistencia es uno de los parámetros utilizados para describir las propiedades mecánicas de los

biofilms, esto último definido como la capacidad de un material para resistir las fuerzas aplicadas, tales como el *shear* que se origina por el flujo de alimentos líquidos o por los protocolos de limpieza y desinfección utilizados rutinariamente.

Se puede suponer que aquellas especies capaces de formar redes ya sean de pseudohifas y /o hifas sobre superficies inertes (acero inoxidable, plásticos, membranas de filtración, etc.) van a poder adherirse más fácilmente y desarrollan biofilms más resistentes al efecto de arrastre del líquido que fluye a través del sistema. En cuanto a las membranas de filtración, la condición hidrodinámica que prevalece en las plantas de productoras de jugo clarificado de manzana es el flujo turbulento (Yazdanshenas y col. 2005). Bajo estas circunstancias la capacidad de *C. krusei* y *C. tropicalis* para adherirse fuertemente a superficies como el acero inoxidable les proporciona una ventaja competitiva. En el caso de *C. kefyr*, puede persistir formando acúmulos y asociándose a otras especies que sí lo hacen.

Rhodotorula mucilaginosa no se recuperó del sistema en ningún caso. La diversidad en un biofilm está moldeada por una variedad de relaciones complejas que implican interacciones inter e intra especies (Berry y col. 2006; Elenter y col. 2007; Hansen y col. 2007). En el caso de Kreth y col. (2005) se postuló que cuando dos especies crecen simultáneamente, ambas proliferan, sin embargo el establecimiento previo de una de las especies impide que otra ocupe el mismo lugar; sumado a esto una alta tasa de crecimiento concomitante con la multiplicación rápida de las células puede acelerar la inanición y el aumento del estrés ambiental (Palková y Váchová 2006).

Tanto el transporte de masa como el esfuerzo de corte de los fluidos son dependientes de las fuerzas hidrodinámicas, por lo tanto el patrón de flujo influirá significativamente en los procesos involucrados con la dinámica de formación de los biofilms (Radu y col. 2012). Se esperaría por lo tanto que cuanto mayor sea la velocidad de flujo, mayor sea la velocidad de transferencia de masa desde y hacia el biofilms (tanto de nutrientes como de detritos) y por lo tanto el crecimiento sea mayor. Esto explicaría el mayor desarrollo bajo flujo turbulento con respecto al estático; el aumento en el flujo representaría un mecanismo de renovación de nutrientes y de disposición de los metabolitos producidos por la comunidad.

Por otra parte, el desarrollo neto de un biofilm está determinado por el equilibrio entre el crecimiento y la tasa de desprendimiento, implicando a su vez altas velocidades (grandes fuerzas de arrastre) en la superficie de los biofilms. Si las fuerzas mecánicas aplicadas al biofilm a lo largo del tiempo son constantes, podría dar lugar a un mayor

desprendimiento de biomasa. Sin embargo, a largo plazo, los biofilms más densos, más fuertes y más resistentes se desarrollan a velocidades de *shear stress* mayores (Van Loosdrecht y col. 1995; Horn y col. 2003). La forma en la que el flujo afecta los parámetros descriptivos de un biofilm puede explicarse considerando los factores que influyen en el crecimiento de los mismos: la velocidad y los nutrientes (Bott 1995). La velocidad de flujo determina tanto el *shear* como la transferencia de masa del sistema (Stoodley y col. 1998), tomándose esta última como la capacidad de acercar los sólidos en suspensión a la matriz del biofilm. A medida que el espesor del biofilm aumenta, la transferencia de masa se vuelve crítica, necesitando mayores flujos para un correcto aporte de nutrientes lo cual conlleva un mayor y más estable crecimiento (Stewart y Franklin 2008).

El flujo es uno de los mecanismos mediante los cuales se produce la transferencia de masa entre los agregados microbianos y la matriz líquida; es por esto que a medida que las fuerzas de arrastre aumentan, tanto el oxígeno, los nutrientes como los desechos que se producen en los biofilms (células muertas, productos metabólicos) también lo hacen. Cuando los mismos se desarrollan bajo condiciones estáticas, deberían adoptar algún mecanismo mediante el cual estos parámetros puedan ser alcanzados, en este caso a través de canales que permiten el correcto flujo entre la matriz microbiana y el medio líquido, generando biofilms más porosos. Estudios previos mencionan la importancia de la presencia de canales de agua dentro de los biofilms de manera de facilitar el transporte a lo largo de la comunidad de microorganismos (Stoodley y Lewandowski 1994; Stoodley y col. 1998). Los biofilms maduros presentan una actividad metabólica que puede llevar a modificaciones en la interfase superficie/solución induciendo cambios en el tipo y concentración de iones, pH, niveles de oxígeno, capacidad amortiguadora dentro del microambiente en la interfaz, entre otros (Videla y Characklis 1992; Xu y col. 2017). De esta manera, a medida que disminuye el flujo hidrodinámico, los biofilms como consorcios de microorganismos organizados deben idear estrategias para solucionar el problema y prevalecer.

Una de las razones por las cuales un biofilm desarrollado bajo condiciones estáticas presentaría un espesor menor con respecto al de la condición de flujo turbulento, podría ser que esta condición permite la acumulación de señales de desprendimiento. En el Capítulo 2 se mencionó que una de las formas de comunicación en los biofilms es el *quorum sensing*, a través de la liberación de moléculas reguladoras. Los biofilms, como comunidades complejas de microorganismos con fenotipos únicos o característicos

presentan en su formación un conjunto de respuestas moduladas por la percepción de señales ambientales a través de sistemas específicos que les permiten sobrevivir aún en ambientes adversos (De Sordi y Mühlischlegel 2009; Garde y col. 2015). Estas señales de desprendimiento podrían acumularse alcanzando finalmente una concentración suficiente para activar la dispersión del biofilm. Hunt y col. (2004) observaron que se puede simular el desprendimiento de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* deteniendo el flujo de medio de cultivo, sin mezclar el sistema, durante 72 horas.

A medida que aumenta el grosor del biofilm, las limitaciones de transferencia de masa se hacen cada vez más importantes (Stewart y Franklin 2008). A medida que el caudal aumenta se puede suponer una mayor transferencia de masa con lo cual se tendría mayor aporte de nutrientes (Teodósio y col. 2011). En nuestro caso, aumentando la velocidad de flujo y la concentración del jugo aumentaría el suministro de nutrientes lo que explicaría la obtención de biofilms más gruesos a 12 °Brix que a 6 °Brix. Varios grupos que trabajan con biofilms mixtos han observado que el aumento de la concentración de nutrientes promueve el aumento del grosor del biofilm (Peyton 1996; Stoodley y col. 1998; Rochex y Lebeault 2007; Simões y col. 2010).

En el caso de Ohl y col. (2004) estudiando sistemas de cañerías de suministro de agua potable, se vio que aumentando la velocidad de flujo en la fase de masa, aumentaba la densidad de los biofilms con un mejor fenómeno de transporte en el nivel de sustrato. En tanto que Howsam (1995) estableció que a velocidades de 0,4 – 4 m/seg los procesos de biofouling más marcados se dan a velocidades altas, sumado a lo establecido por Santos y col. (1991) que cuando se cultivó *Pseudomonas fluorescens* en agua filtrada a 2,5 m/seg, el biofilm fue de un grosor mayor que el formado a 0,5 m/seg. Nuestros hallazgos están en concordancia con aquellos estudios desarrollados para biofilms de *Candida albicans* formados en presencia de un fluido en movimiento, en donde se encontró que dicha especie producía grandes cantidades de matriz extracelular y una mayor densidad celular en comparación con lo sucedido cuando la misma era cultivada en condiciones estáticas (Hawser y col. 1998; Al-Fattani y Douglas 2006; Ramage y col. 2008).

Para comparar la estructura tridimensional de los biofilms se utilizaron las imágenes obtenidas por CLSM. Como ya se mencionó, 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 (Lelièvre y col. 2002; Blel y col. 2007). Por ejemplo, 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. *vs* las membranas, donde la circulación es bajo condiciones de flujo turbulento.

Las propiedades mecánicas de los biofilms generalmente se obtienen sometiendo a las muestras a pruebas estáticas o dinámicas específicas, que implican una variedad de parámetros como resistencia a la tracción, módulo de elasticidad, módulo de cizallamiento y esfuerzo de compresión (Towler y col. 2003; Coufort y col. 2007; Aggarwal y Hozalski 2010).

En todos los casos G' fue mayor que G'' confirmando que los biofilms de levaduras se comportan como materiales viscoelásticos. Cuando se aplica una fuerza de deformación a un material débil, la estructura resiste (G'' aumenta) hasta un cierto punto de tensión en donde la estructura se rompe para luego alinearse las cadenas del polímero con el campo de flujo disminuyendo G'' . Es conocido, por ejemplo, que las cadenas individuales de los polímeros formando parte del EPS extraído y purificado de bacterias, tales como alginatos, gellan y xantano forman comúnmente estructuras multihebras (Sutherland 1994; McIntire y Brant 1997), las cuales gracias a la presencia de enlace hidrógeno pueden formar geles viscoelásticos altamente hidratados (Allison y Matthews 1992; Sutherland 1994; Ross-Murphy y col. 1996; Sutherland 2001). La mayoría de los biopolímeros son viscoelásticos, exhibiendo un comportamiento tanto de sólidos (elástico) como de líquidos (viscoso) (Vincent 2012). Un material elástico se deforma inmediatamente cuando es sometido a una fuerza para luego volver a su forma original una vez que se retira la fuerza aplicada. En este sentido el módulo elástico y viscoso son medidas de la rigidez del material.

Combinando los resultados de la microestructura y de la reología se observó que los biofilms bajo flujo turbulento eran más gruesos y estructuralmente más fuertes que aquellos cultivados en condiciones estáticas. Además, la concentración del jugo afectó significativamente el espesor del biofilm, pero no así sus propiedades reológicas. Estos resultados sugieren que el flujo turbulento favorece el crecimiento de las células de levadura y las fuerzas cohesivas entre ellas, pero el crecimiento también se ve afectado por la disponibilidad de nutrientes.

Hasta la fecha, se han llevado a cabo pocos estudios sobre las propiedades mecánicas de los biofilms sin perturbaciones (Towler y col. 2003; Pavlovsky y col. 2013), siendo estos resultados uno de los pocos realizados en la materia.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, S. y Hozalski, R. M. (2010). "Determination of biofilm mechanical properties from tensile tests performed using a micro-cantilever method." *Biofouling* **26**(4): 479-486.
- Al-Fattani, M. A. y Douglas, L. J. (2006). "Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance." *Journal of Medical Microbiology* **55**(8): 999-1008.
- Allison, D. y Matthews, M. (1992). "Effect of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Applied Bacteriology* **73**(6): 484-488.
- Baillie, G. S. y Douglas, L. J. (1999). "Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms." *Journal of Medical Microbiology* **48**(7): 671-679.
- Berry, D., Xi, C. y Raskin, L. (2006). "Microbial ecology of drinking water distribution systems." *Current Opinion in Biotechnology* **17**(3): 297-302.
- Blel, W., Bénézech, T., Legentilhomme, P., Legrand, J. y 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.
- Bott, T. (1995). "Biological growth on heat exchanger surfaces." *Fouling of Heat Exchangers*: 1-515.
- Boyle, J. D., Dodds, I., Stoodley, P. y Lappin-Scott, H. (1997). Stress management in biofilms. Biofilms: Community interactions and control. Reino Unido, Cardiff : BioLine for the British Biofilm Club: 15-22.
- Braun, P. C. y Calderone, R. (1978). "Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms." *Journal of Bacteriology* **133**(3): 1472-1477.
- Brugnoni, L., Cubitto, M. y Lozano, J. (2011a). "Biofilm formation under laminar flow conditions of yeast isolated from an apple juice processing plant." *Journal of Food Process Engineering* **34**(1): 49-66.
- Brugnoni, L., Lozano, J. y Cubitto, M. (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.
- Brugnoni, L. I., Cubitto, M. A. y Lozano, J. E. (2011b). "Role of shear stress on biofilm formation of *Candida krusei* in a rotating disk system." *Journal of Food Engineering* **102**(3): 266-271.
- Brugnoni, L. I., Cubitto, M. A. y 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.
- Brugnoni, L. I., Tarifa, M. C., Lozano, J. E. y Genovese, D. (2014). "In situ rheology of yeast biofilms." *Biofouling* **30**(10): 1269-1279.

Costerton, J. W., Cheng, K., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. y Marrie, T. J. (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease." *Annual Reviews in Microbiology* **41**(1): 435-464.

Coufort, C., Derlon, N., Ochoa, J., Liné, A. y Paul, E. (2007). "Cohesion and detachment in biofilm systems for various environmental conditions." *Water Science and Technology* **55**(8-9): 421-428.

Cristescu, N. (2012). *Rock rheology*, Springer Science & Business Media. **7**, 336 p.

Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. y Martínez, J. P. (1998). "Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**(1): 130-180.

Characklis, W. (1981). "Bioengineering report: fouling biofilm development: a process analysis." *Biotechnology and Bioengineering* **23**(9): 1923-1960.

Characklis, W. G., Trulear, M., Bryers, J. D. y Zilver, N. (1982). "Dynamics of biofilm processes: methods." *Water Research* **16**(7): 1207-1216.

Chen, B., Sun, K. y Ren, T. (2005). "Mechanical and viscoelastic properties of chitin fiber reinforced poly (ϵ -caprolactone)." *European Polymer Journal* **41**(3): 453-457.

De Sordi, L. y 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.

Dealy, J. M. y Wissbrun, K. F. (2012). *Melt rheology and its role in plastics processing: theory and applications*. Países Bajos, Springer Science & Business Media, 680 p.

Elenter, D., Milferstedt, K., Zhang, W., Hausner, M. y Morgenroth, E. (2007). "Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm." *Water Research* **41**(20): 4657-4671.

Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D. y Fredberg, J. J. (2001). "Scaling the microrheology of living cells." *Physical Review Letters* **87**(14): 148102.

Flemming, H.-C. (2011). "The perfect slime." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **86**(2): 251-259.

Garde, C., Welch, M., Ferkinghoff-Borg, J. y Sams, T. (2015). "Microbial biofilm as a smart material." *Sensors* **15**(2): 4229-4241.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. y Stoodley, P. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nature Reviews Microbiology* **2**(2): 95-108.

Hansen, S. K., Rainey, P. B., Haagenen, J. A. y Molin, S. (2007). "Evolution of species interactions in a biofilm community." *Nature* **445**(7127): 533-536.

Hawser, S., Baillie, G. y Douglas, L. J. (1998). "Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms." *Journal of Medical Microbiology* **47**(3): 253-256.

Hicks, D. (1990). Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages, Kluwer Academic Publishers, 397 p.

Horn, H., Reiff, H. y Morgenroth, E. (2003). "Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions." *Biotechnology and Bioengineering* **81**(5): 607-617.

Houari, A., Picard, J., Habarou, H., Galas, L., Vaudry, H., Heim, V. y Di Martino, P. (2008). "Rheology of biofilms formed at the surface of NF membranes in a drinking water production unit." *Biofouling* **24**(4): 235-240.

Howsam, P. (1995). "A question of scale and slime." *Water and Wastewater Treatment*: 39-47.

Hunt, S. M., Werner, E. M., Huang, B., Hamilton, M. A. y Stewart, P. S. (2004). "Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(12): 7418-7425.

Klapper, I., Rupp, C., Cargo, R., Purvedorj, B. y Stoodley, P. (2002). "Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties." *Biotechnology and Bioengineering* **80**(3): 289-296.

Kreth, J., Merritt, J., Shi, W. y Qi, F. (2005). "Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm." *Journal of Bacteriology* **187**(21): 7193-7203.

Laba, D. (1993). Rheological properties of cosmetics and toiletries. EE.UU., CRC Press, 440 p.

Lappin-Scott, H., Costerton, J. y Marrie, T. (1992). "Biofilms and biofouling." *Encyclopedia of Microbiology* **1**: 277-284.

Lee, C. Y. y Mattick, L. R. (1989). Composition and nutritive value of apple products. Processed apple products. Nueva York, EE.UU., Springer: 303-322.

Lelièvre, C., Legentilhomme, P., Gaucher, C., Legrand, J., Faille, C. y 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.

Levich, V. G. y Technica, S. (1962). Physicochemical hydrodynamics. Nueva Jersey, EE.UU., Prentice-hall Englewood Cliffs. **689**, 700 p.

Lindsay, D. y Von Holy, A. (1997). "Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms." *Food Microbiology* **14**(4): 383-390.

Lozano, J. E. (2006). Fruit manufacturing. Nueva York, EE.UU., Springer, 230 p.

Marshall, K. C. (1992). "Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. Control of biofilm formation awaits the development of a method to prevent bacterial adhesion." *ASM American Society for Microbiology News* **58**(4): 202-207.

- McGrath, M. A. (1987). "Blood Viscosity—Hyperviscosity & Hyperviscosaemia." *Pathology* **19**(1): 112.
- McIntire, T. M. y Brant, D. A. (1997). "Imaging of individual biopolymers and supramolecular assemblies using noncontact atomic force microscopy." *Biopolymers* **42**(2): 133-146.
- Mofrad, M. R. (2009). "Rheology of the cytoskeleton." *Annual Review of Fluid Mechanics* **41**: 433-453.
- Nadell, C. D., Foster, K. R. y Xavier, J. B. (2010). "Emergence of spatial structure in cell groups and the evolution of cooperation." *PLoS Computational Biology* **6**(3): e1000716.
- Ohashi, A. y Harada, H. (1994). "Adhesion strength of biofilm developed in an attached-growth reactor." *Water Science and Technology* **29**(10-11): 281-288.
- Ohl, A. L., Horn, H. y Hempel, D. (2004). "Behaviour of biofilm systems under varying hydrodynamic conditions." *Water Science and Technology* **49**(11-12): 345-351.
- Palková, Z. y Váchová, L. (2006). "Life within a community: benefit to yeast long-term survival." *FEMS Microbiology Reviews* **30**(5): 806-824.
- Paramonova, E., Krom, B. P., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. y Sharma, P. K. (2009). "Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms." *Microbiology* **155**(6): 1997-2003.
- Paul, E., Ochoa, J. C., Pechaud, Y., Liu, Y. y Liné, A. (2012). "Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms." *Water Research* **46**(17): 5499-5508.
- Pavlovsky, L., Younger, J. G. y Solomon, M. J. (2013). "In situ rheology of *Staphylococcus epidermidis* bacterial biofilms." *Soft Matter* **9**(1): 122-131.
- Peyton, B. M. (1996). "Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density." *Water Research* **30**(1): 29-36.
- Picologlou, B. F., Characklis, W. G. y Zilver, N. (1980). "Biofilm growth and hydraulic performance." *Journal of the Hydraulics Division* **106**(5): 733-746.
- Pilavtepe-Çelik, M., Balaban, M., Alpas, H. y Yousef, A. (2008). "Image analysis based quantification of bacterial volume change with high hydrostatic pressure." *Journal of Food Science* **73**(9): M423-M429.
- Radu, A. I., Vrouwenvelder, J. S., Van Loosdrecht, M. y Picioreanu, C. (2012). "Effect of flow velocity, substrate concentration and hydraulic cleaning on biofouling of reverse osmosis feed channels." *Chemical Engineering Journal* **188**: 30-39.
- Ramage, G., Wickes, B. L. y López-Ribot, J. L. (2008). "A seed and feed model for the formation of *Candida albicans* biofilms under flow conditions using an improved modified Robbins device." *Revista Iberoamericana de Micología* **25**(1): 37.

Rochex, A. y Lebeault, J.-M. (2007). "Effects of nutrients on biofilm formation and detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine." *Water Research* **41**(13): 2885-2892.

Rogers, S., Van Der Walle, C. y Waigh, T. (2008). "Microrheology of bacterial biofilms in vitro: *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Langmuir* **24**(23): 13549-13555.

Ross-Murphy, S., Shatwell, K., Sutherland, I. y Dea, I. (1996). "Influence of acyl substituents on the interaction of xanthans with plant polysaccharides." *Food Hydrocolloids* **10**(1): 117-122.

Rupp, C. J., Fux, C. A. y Stoodley, P. (2005). "Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(4): 2175-2178.

Santos, R., Callow, M. E. y Bott, T. (1991). "The structure of *Pseudomonas fluorescens* biofilms in contact with flowing systems." *Biofouling* **4**(4): 319-336.

Shaw, T., Winston, M., Rupp, C., Klapper, I. y Stoodley, P. (2004). "Commonality of elastic relaxation times in biofilms." *Physical Review Letters* **93**(9): 098102.

Simões, L. C., Simoes, M. y 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): 6673-6679.

Skalak, R., Chien, S. y Mates, R. (1987). Handbook of bioengineering. EE.UU., McGraw-Hill 915 p.

Spanos, G. A. y Wrolstad, R. E. (1990). "Influence of variety, maturity, processing and storage on the phenolic composition of pear juice." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**(3): 817-824.

Spanos, G. A. y Wrolstad, R. E. (1992). "Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. A review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**(9): 1478-1487.

Squires, T. M. y Mason, T. G. (2009). "Fluid mechanics of microrheology." *Annual Review of Fluid Mechanics* **42**(1): 413.

Steffe, J. F. (1996). Rheological methods in food process engineering. Michigan, EE.UU., Freeman press, 418 p.

Stewart, P. S. y Franklin, M. J. (2008). "Physiological heterogeneity in biofilms." *Nature Reviews Microbiology* **6**(3): 199-210.

Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C., Wilson, S. y Klapper, I. (2002a). "Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29**(6): 361-367.

Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J. y Lappin-Scott, H. (1998). "Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure." *Journal of Applied Microbiology* **85**(S1).

- Stoodley, P. y Lewandowski, Z. (1994). "Liquid flow in biofilm systems." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(8): 2711-2716.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. y Costerton, J. W. (2002b). "Biofilms as complex differentiated communities." *Annual Reviews in Microbiology* **56**(1): 187-209.
- Sutherland, I. W. (1994). "Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides." *Biotechnology Advances* **12**(2): 393-448.
- Sutherland, I. W. (2001). "The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment." *Trends in Microbiology* **9**(5): 222-227.
- Tabilo-Munizaga, G. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). "Rheology for the food industry." *Journal of Food Engineering* **67**(1): 147-156.
- Tarifa, M. C., Genovese, D., Lozano, J. y Brugnoli, L. (2017). Microstructural and rheological characterization of *in situ* yeast biofilms. Sent Soft Matter.
- Teodósio, J., Simões, M., Melo, L. y Mergulhão, F. (2011). "Flow cell hydrodynamics and their effects on *E. coli* biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow." *Biofouling* **27**(1): 1-11.
- Thavarajah, P. y Low, N. H. (2006). "Adulteration of apple with pear juice: emphasis on major carbohydrates, proline, and arbutin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(13): 4861-4867.
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L. y Kadosh, D. (2011). "Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species." *Eukaryotic Cell* **10**(9): 1173-1182.
- Towler, B. W., Rupp, C. J., Cunningham, A. B. y Stoodley, P. (2003). "Viscoelastic properties of a mixed culture biofilm from rheometer creep analysis." *Biofouling* **19**(5): 279-285.
- Van Loosdrecht, M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L. y Heijnen, J. (1995). "Biofilm structures." *Water Science and Technology* **32**(8): 35-43.
- Verdier, C., Etienne, J., Duperray, A. y Preziosi, L. (2009). "Review: Rheological properties of biological materials." *Comptes Rendus Physique* **10**(8): 790-811.
- Videla, H. A. y Characklis, W. G. (1992). "Biofouling and microbially influenced corrosion." *International Biodeterioration & Biodegradation* **29**(3): 195-212.
- Vieira, M. J., Melo, L. F. y Pinheiro, M. M. (1993). "Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure." *Biofouling* **7**(1): 67-80.
- Vincent, J. F. (2012). Structural biomaterials. EE.UU., Princeton University Press, 240 p.
- Visser, J. (1973). Council of National Academic Award, London University. **Dr.**
- Walker, J., Mackerness, C., Mallon, D., Makin, T., Williets, T. y Keevil, C. (1995). "Control of *Legionella pneumophila* in a hospital water system by chlorine dioxide." *Journal of Industrial Microbiology* **15**(4): 384-390.

Wilhelm, C. (2008). "Out-of-equilibrium microrheology inside living cells." *Physical Review Letters* **101**(2): 028101.

Wilking, J. N., Angelini, T. E., Seminara, A., Brenner, M. P. y Weitz, D. A. (2011). "Biofilms as complex fluids." *MRS bulletin* **36**(05): 385-391.

Xu, D., Xia, J., Zhou, E., Zhang, D., Li, H., Yang, C., y col. (2017). "Accelerated corrosion of 2205 duplex stainless steel caused by marine aerobic *Pseudomonas aeruginosa* biofilm." *Bioelectrochemistry* **113**: 1-8.

Yazdanshenas, M., Tabatabaenezhad, A., Roostaazad, R. y Khoshfetrat, A. (2005). "Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration." *Separation and Purification Technology* **47**(1): 52-57.

Zaccarelli, E. (2007). "Colloidal gels: equilibrium and non-equilibrium routes." *Journal of Physics: Condensed Matter* **19**(32): 323101.

Zottola, E. A. y Sasahara, K. C. (1994). "Microbial biofilms in the food processing industry—Should they be a concern?" *International Journal of Food Microbiology* **23**(2): 125-148.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo de la presente tesis se planteó con el objetivo general de profundizar el conocimiento sobre la formación de biofilms microbianos en membranas de ultrafiltración, de manera de proveer las bases para la generación de soluciones eficientes a los problemas microbiológicos asociados a la producción de jugos de frutas. Teniendo en cuenta que la estabilidad biológica de las modernas plantas productoras de jugo es muy buena durante el primer año de producción es común observar que comienzan a aparecer problemas de contaminación del producto durante el segundo año a partir de su instalación. En función de esto se plantearon cuatro grandes ejes estructurales en esta tesis. En una primera instancia, se reconocieron los actores responsables del problema, seguido del estudio de las interacciones multi especie entre sus integrantes y/o con aquellos patógenos que pudieran ingresar al sistema, para luego aproximarse al sistema real de las plantas productoras de jugo a través de sistemas de filtración con ciclos de producción y de limpieza/desinfección. Por último se planteó uno de los pilares más novedosos de la tesis: el estudio reológico de los biofilms desde una perspectiva diferente, realizándose las mediciones *in situ*. En todos los casos, los ensayos que planteamos trataron de aproximar lo que sucede en el modelo real, de manera de que los resultados y las conclusiones sean concretos, minimizando las extrapolaciones.

Trabajando con industrias asociadas a la producción de jugo de manzana y pera, los cuales se caracterizan por su bajo pH y alto contenido de azúcares, tenemos como principal contaminante a las levaduras. Este hecho es ratificado por los resultados obtenidos a partir del **Capítulo 1** donde a través del análisis de muestras de membranas utilizadas para la clarificación de jugo se pudo observar la predominancia de las mismas, demostrando su gran habilidad como competidores en sistemas sometidos a ciclos de limpieza y desinfección.

Posteriormente se procedió al análisis de las características de superficie celular de las levaduras aisladas, evaluándose la naturaleza química de la misma. Si bien se encontró, como era de esperarse por las características del sustrato del que fueron aisladas, una mayor cantidad de cepas hidrofóbicas, también se halló una con superficie hidrofílica. Esto demuestra la gran plasticidad que presentan y la dificultad que implica la generación de alternativas para evitar su adhesión. Pudimos concluir que el carácter hidrofóbico de las cepas permitiría a su vez la adhesión de las mismas a otras

superficies con similares características, mientras que la presencia de grupos en la superficie celular dadores o aceptores de electrones les permitiría adherirse a superficies químicamente complementarias.

Se ha mencionado que el estudio de biofilms mono especie no es del todo comparable con lo que sucede en la realidad en cualquier sistema que se esté analizando, desde natural hasta industrial. Teniendo esto en mente se plantearon los objetivos del **Capítulo 2** en donde se estudió la dinámica de adhesión y formación de biofilms mono y multi especie bajo condiciones de relevancia industrial. Para esto se utilizaron las especies de levaduras aisladas del sistema y se co-cultivaron con bacterias patógenas (*Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp.) a fin de observar las implicancias que podría tener la coexistencia de ambas en biofilms. Se llegó a la conclusión que patógenos bacterianos, tales como los mencionados, y levaduras, pueden interactuar dentro de comunidades sésiles formadas en superficies de uso alimentario, como el acero inoxidable. En este estudio se observó un efecto neto positivo para las bacterias en contraste con el obtenido para las levaduras. Este hecho refuerza el riesgo que implican las interacciones de patógenos con miembros de la microbiota deteriorante, hecho que reviste más gravedad si se considera que las células bacterianas prefirieron la adhesión a las células de levadura en lugar de las superficies de acero inoxidable. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede resaltar la importancia del estudio de biofilms multiespecie donde se observan fenotipos alternativos a sus equivalentes monoespecie, pudiéndose definir nuevas condiciones que desencadenen en la formación de biofilms con mayor capacidad adaptativa.

En el **Capítulo 3** se estudió la dinámica de adhesión y formación de biofilms sobre las membranas de ultrafiltración. Con esto se buscó acercarse un paso más a lo que sucede en las plantas productoras de jugo. Realizándose el análisis de la eficacia de los agentes desinfectantes, se observó una mayor resistencia en aquellos microorganismos que están adheridos en comparación con su forma planctónica, además de la ventaja que les provee a los mismos estar adheridos a superficies porosas como lo son las membranas. Este punto de producción representa un *hot spot* para el proceso de *biofouling*, siendo probablemente el mayor desafío en los procesos de limpieza y desinfección. A la fecha, este es uno de los primeros estudios que se realizan bajo condiciones de relevancia para la industria juguera, dejando en evidencia la complejidad de la eliminación de biofilms una vez establecidos y alertando sobre el compromiso de la estabilidad microbiológica de las plantas procesadoras una vez establecidos los microorganismos en ellas.

En los últimos años ha crecido el interés en el estudio de las propiedades reológicas de los biofilms, en particular si afectan la sanidad de equipos de procesado de alimentos. Debido a lo anterior, en el **Capítulo 4** se realizó el estudio reológico de biofilms sin removerlos (*in situ*) de la superficie en donde se desarrollaron. De esta manera se buscó preservar sus características. Analizándose las diferentes condiciones de relevancia industrial que ya fueron debidamente mencionadas, se encontró que bajo flujos turbulentos se favorecía el desarrollo de biofilms más compactos y resistentes a las fuerzas de arrastre que los encontrados cuando las condiciones del medio líquido eran estáticas. En el mismo sentido es que el comportamiento de los mismos presentó características similares a las encontradas para materiales sólidos.

Como consecuencia de lo mencionado anteriormente, a nuestro entender se concretó el objetivo principal planteado en esta tesis, generando las bases para una mejor comprensión del fenómeno de *biofouling*. Se plantearon los ejes que se consideraron más importantes para el entendimiento de este problema en las plantas productoras de jugo, los cuales pudieran ser desarrollados en el lapso de cuatro años.

El paso posterior al entendimiento del proceso de *biofouling* radicaría en una aproximación de los eventos subyacentes, analizándose, por ejemplo, las bases moleculares de los mismos ahondando en el proceso de *quorum sensing* y en la expresión diferencial de genes a lo largo de diferentes condiciones de cultivo, y estudiando las bases bióticas y abióticas que permiten la diferenciación de las propiedades mecánicas de los biofilms.

ABREVIACIONES

- AA: Ácido adaptadas
- AI: Acero inoxidable
- ANOVA: Análisis de la Varianza
- BAL: Bacteria ácido láctica
- BHT: Bacterias Heterótrofas Totales
- CIP: *Clean in Place*
- CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy
- CIM: Concentración mínima inhibitoria
- DO: Densidad óptica
- DE: Desvío estándar
- EB: *Enterobacteriaceae*
- EPS: Material polimérico extracelular (*Extracellular polymeric substance*)
- FDA: diacetato de fluoresceína
- MATS: Método de adhesión microbiana a solventes (*Microbial Adhesion to Solvents*)
- MF: Microfiltración
- MRS: Man-Rogosa-Sharpe
- NA: No Adaptadas
- NF: Nanofiltración
- OI: Ósmosis inversa
- PBS: Buffer Fosfato Salino (*Phosphate buffered saline*)
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno (*Polyvinylidene fluoride*)
- RVL: Rango viscoelástico lineal
- SDG: Sistema de Disco Giratorio
- SEM: Microscopía de barrido electrónico (*Scanning Electron Microscopy*)
- TSA: agar Trypticase Soja
- TSB: caldo Trypticase Soja
- UF : Ultrafiltración
- UFC: Unidades formadoras de colonias



ANEXO 1

1.1 Microscopia de epifluorescencia (ME) y Microscopia de láser confocal (CLSM)

Para la observación de las muestras por ME y CLSM las mismas fueron teñidas con diacetato de fluoresceína (FDA) ($C_{24}H_{16}O_7$, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.). Esta prueba es ampliamente utilizada como indicador de viabilidad celular; el principio de su utilización radica en que sólo las células metabólicamente activas pueden convertir FDA a fluoresceína siendo esto posible debido a la presencia de membranas intactas y actividad esterasa (Oh y Matsuoka 2002).

A partir de una solución stock de FDA de 0,2 % p/v (2 mg/ml), preparada en acetona (Dorwil, Industria Argentina) y conservada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, se obtuvo la solución de uso de 0,04 % p/v (0,1 mol/l) disolviendo 1 ml de la solución stock en 50 ml de PBS, con la que se tiñeron las muestras a analizar. La solución de uso fue preparada en cada caso en el momento de su utilización.

Las superficies de AI a analizar fueron sumergidas en la solución de uso a $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 min en agitación suave (50 rpm) y oscuridad, luego lavadas dos veces durante 5 minutos cada vez con PBS bajo agitación suave. Hasta el momento de su observación las muestras fueron conservadas en refrigeración y oscuridad para evitar la extinción del fluorocromo.

1.1.1 Microscopia de epifluorescencia

Las observaciones se realizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 51 usando un objetivo apocromático de inmersión en aceite con una escala de reproducción 100 x, dando un aumento total de 1000 x. Se contaron 20 campos por segmento a analizar. El área de campo se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Área} = \pi \times r^2 \quad (1.1)$$

$$r = D/2 \quad (1.2)$$

$$D = n^{\circ} \text{ del ocular } / \text{ER} \quad (1.3)$$

Siendo:

D: diámetro del campo de observación

ER: escala de reproducción del objetivo utilizado para la observación

r: radio del campo

A: área del campo de observación

1.1.2 CLSM

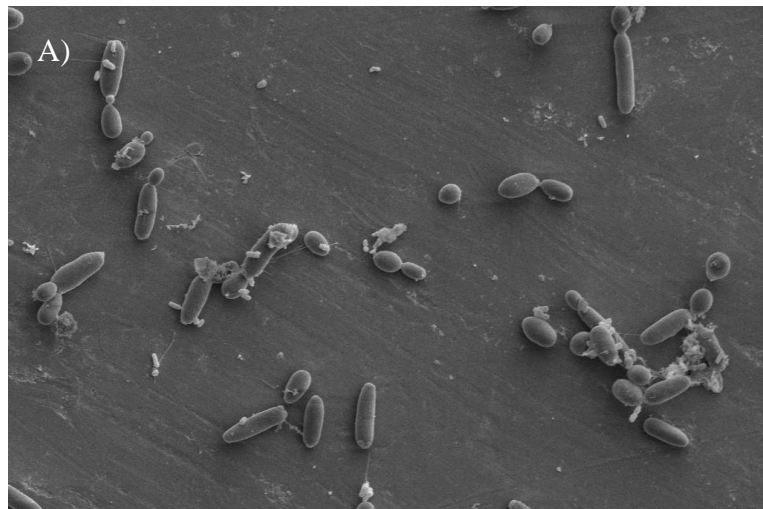
Las muestras se observaron con un microscopio de láser confocal espectral Leica modelo TCS SP2 equipado con tres líneas de láser y sistemas AOTF (filtro sintonizable acusto-óptico) de tres canales y AOBS (divisor de haz acusto-óptico) (Leica Microsystems, Richmond Hill, ON, Canadá). Se utilizó un objetivo de inmersión en agua de 20 x y la captura de las proyecciones 2D a través del software correspondiente al microscopio (Confocal Software, LCS, Leica Microsystems).

La adquisición de imágenes se realizó en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) perteneciente al Servicio de Nacional de Microscopia, Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina).

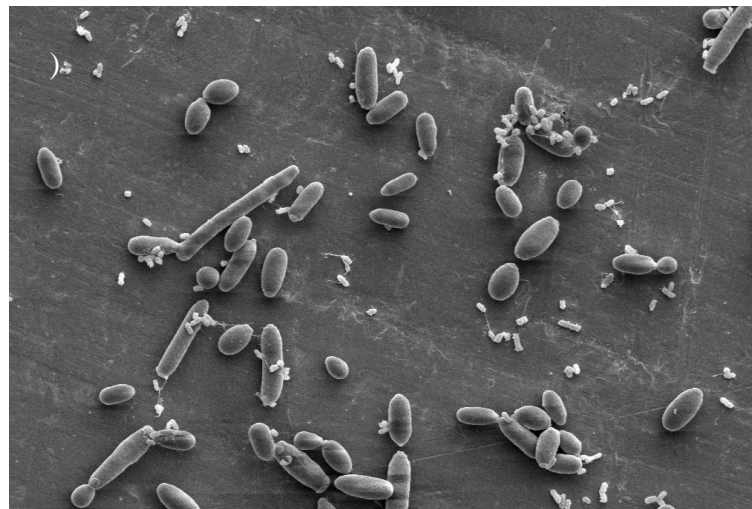
1.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5 % en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,2), lavadas tres veces con el mismo buffer y luego se les realizó punto crítico (E3000, Polaron). Las muestras fueron recubiertas por oro (300 Å) y observadas a través de un microscopio electrónico de barrido (LEO EVO 40, Cambridge, Inglaterra) (Lozano 1990) en el Centro Científico Tecnológico perteneciente al Servicio de Nacional de Microscopia, Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina).

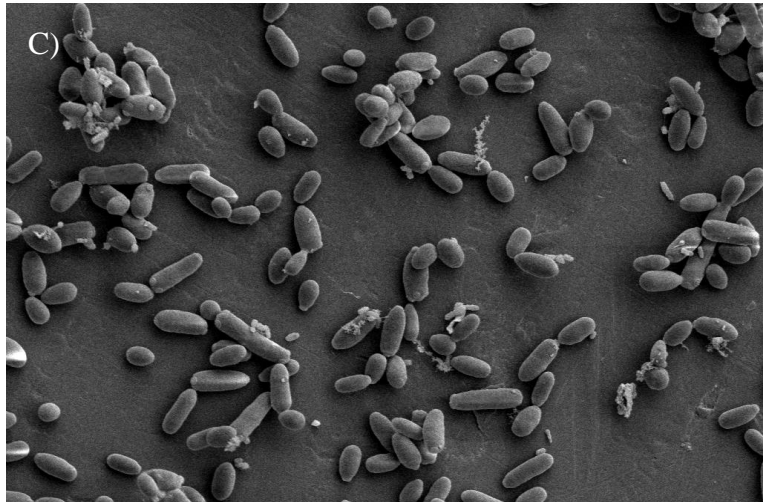
Anexo 2



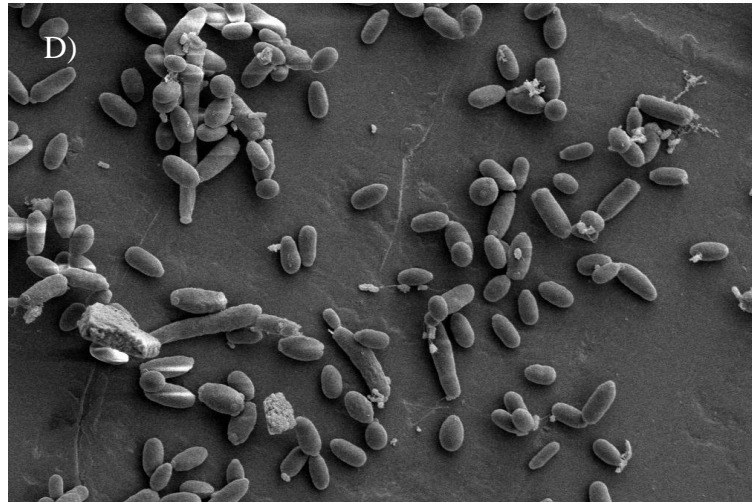
10μm² Mag = 4.00 K X EHT = 7.00 kV WD = 8 mm Photo No. = 192 CCT-BB



10μm² Mag = 4.00 K X EHT = 7.00 kV WD = 8 mm Photo No. = 173 CCT-BB

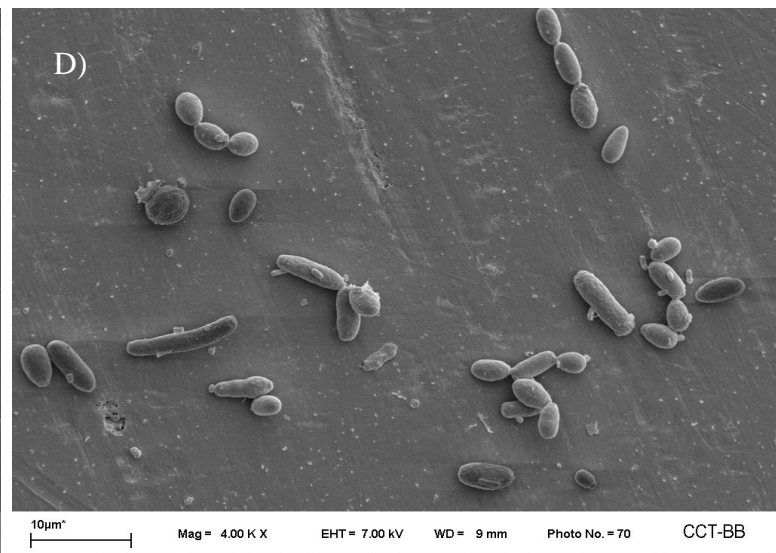
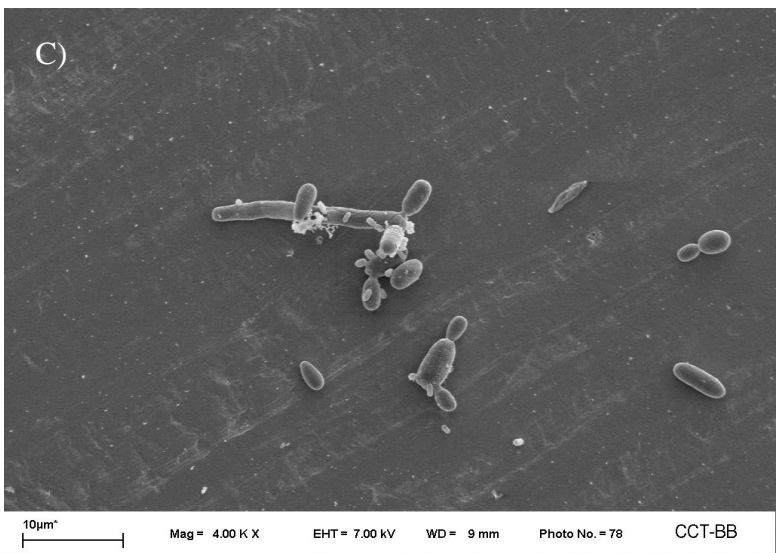
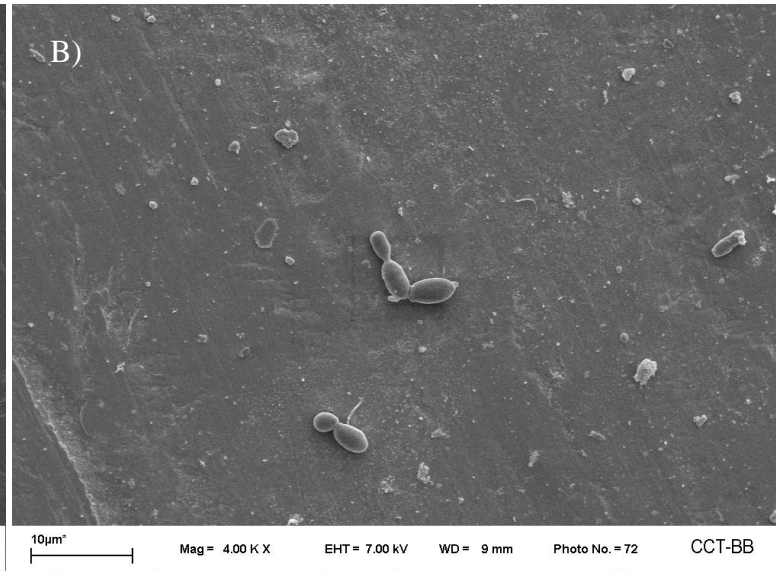
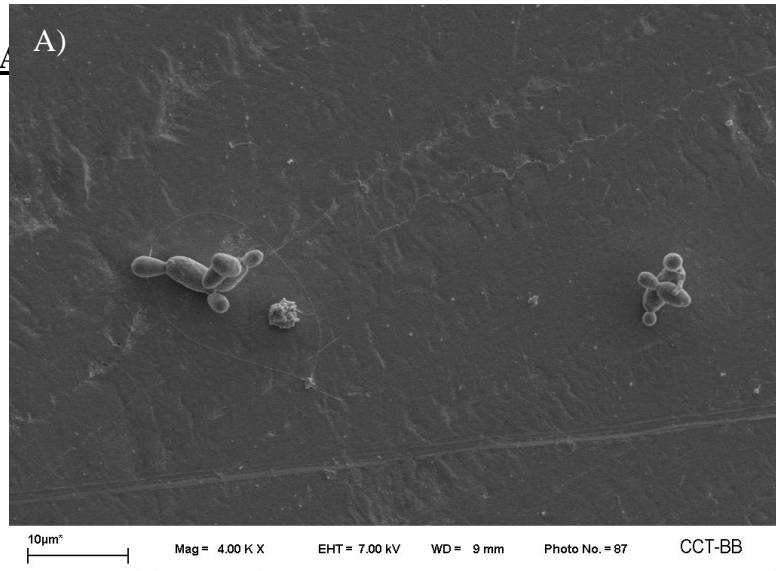


10μm² Mag = 4.00 K X EHT = 7.00 kV WD = 8 mm Photo No. = 180 CCT-BB

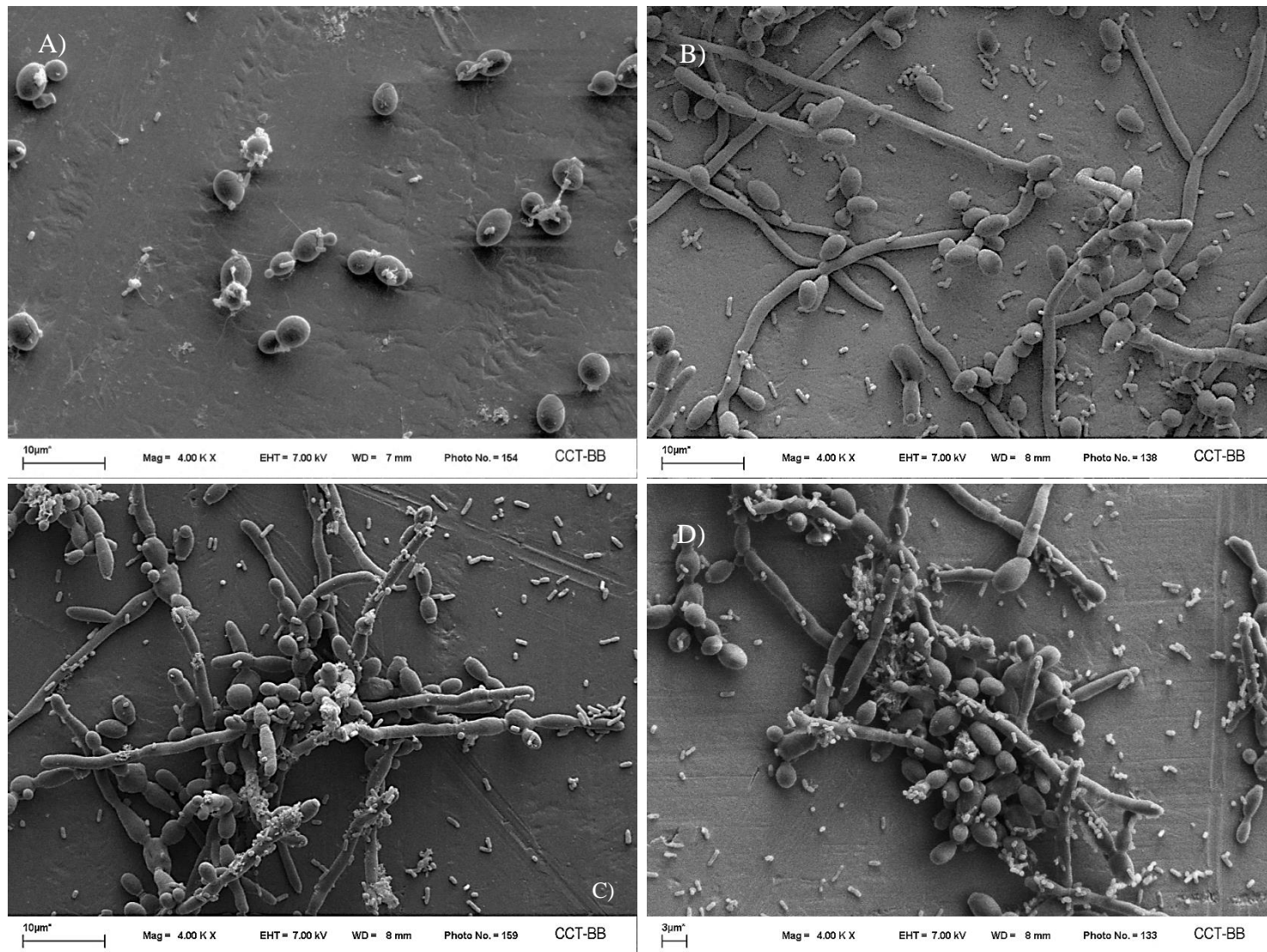


10μm² Mag = 4.00 K X EHT = 7.00 kV WD = 8 mm Photo No. = 178 CCT-BB

Anexo 2- Biofilm dual *C. krusei* y *Salmonella* sp. en jugo de manzana de 12 °Brix. A) 2 hs, B) 8 hs, C) 16 hs y D) 24 hs de contacto

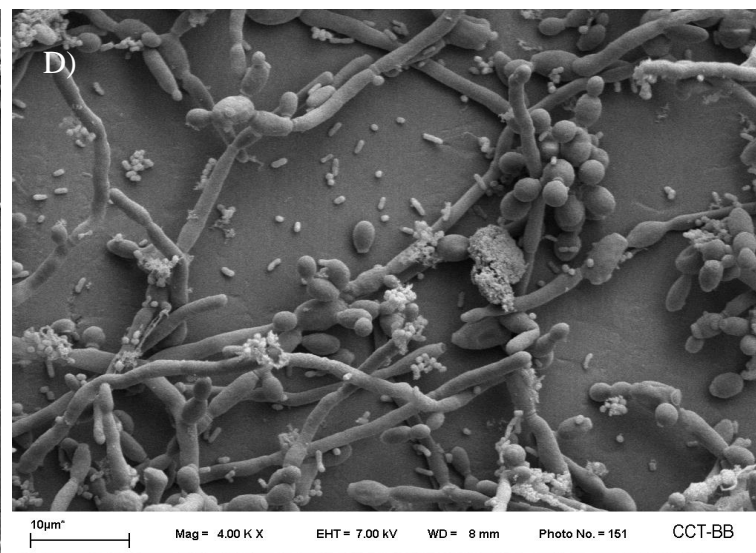
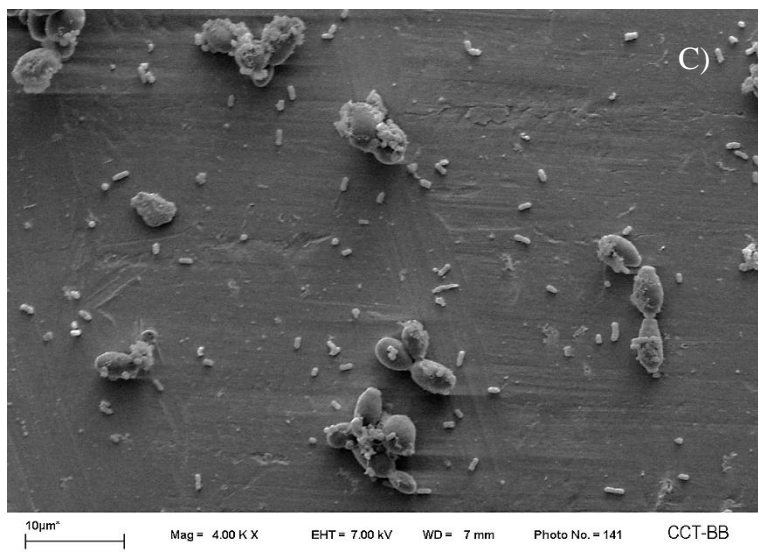
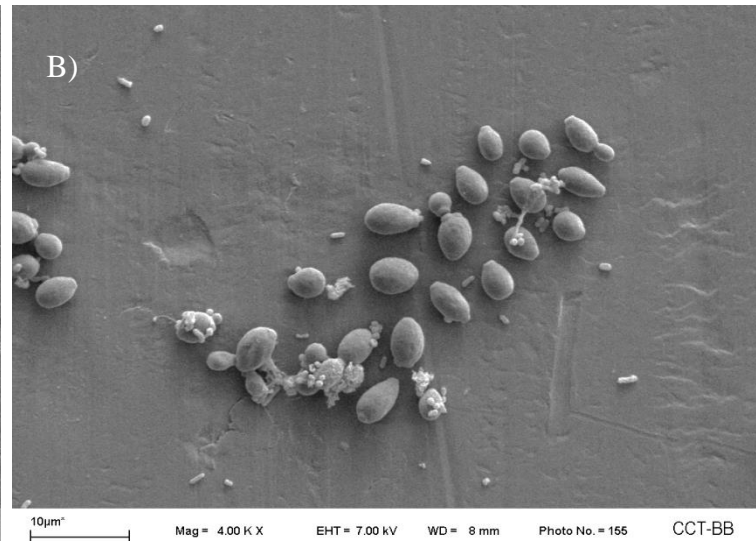
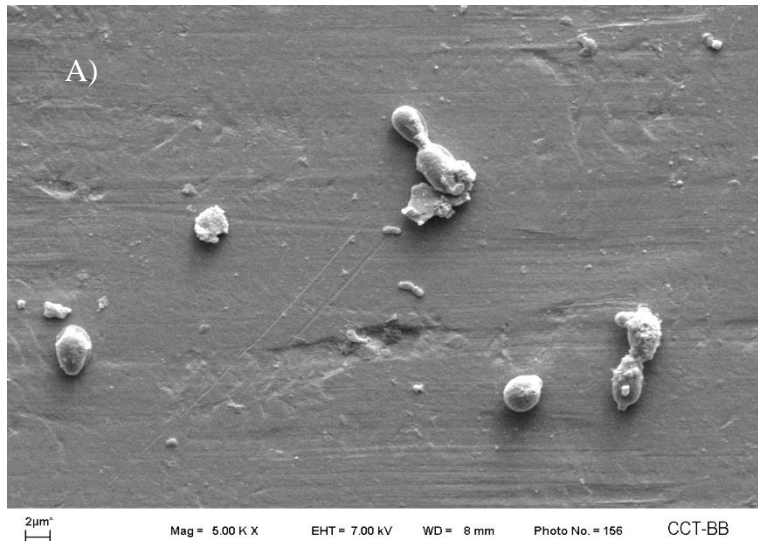


Anexo 2- Biofilm dual *C. krusei* y *E. coli* O157:H7 en jugo de manzana de 12 °Brix. A) 2 hs, B) 8 hs, C) 16 hs y D) 24 hs de contacto

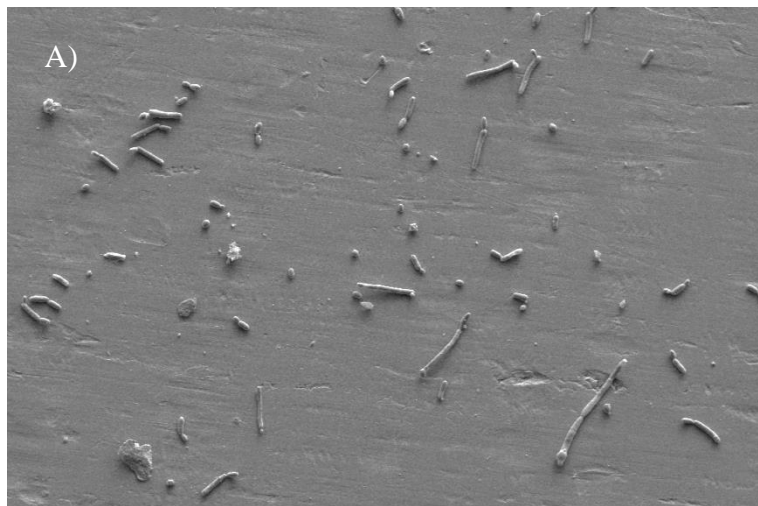
Anexo 2

Anexo 2- Biofilm dual *C. tropicalis* y *Salmonella* sp. en jugo de manzana de 12 °Brix. A) 2 hs, B) 8 hs, C) 16 hs y D) 24 hs de contacto.

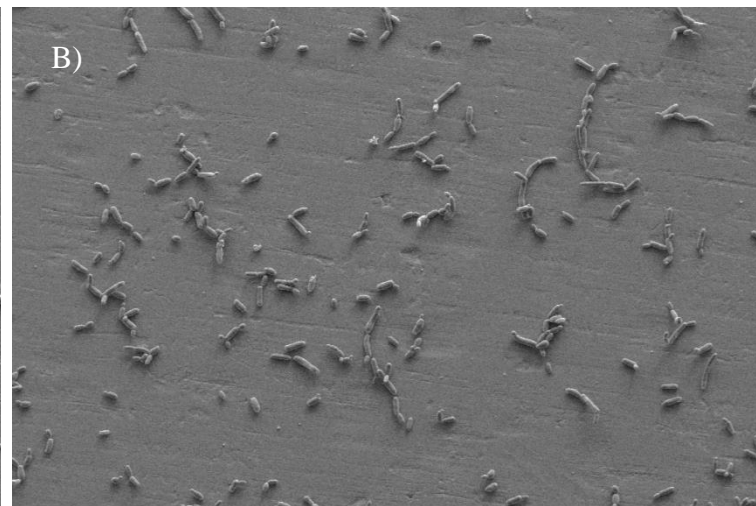
Anexo 2



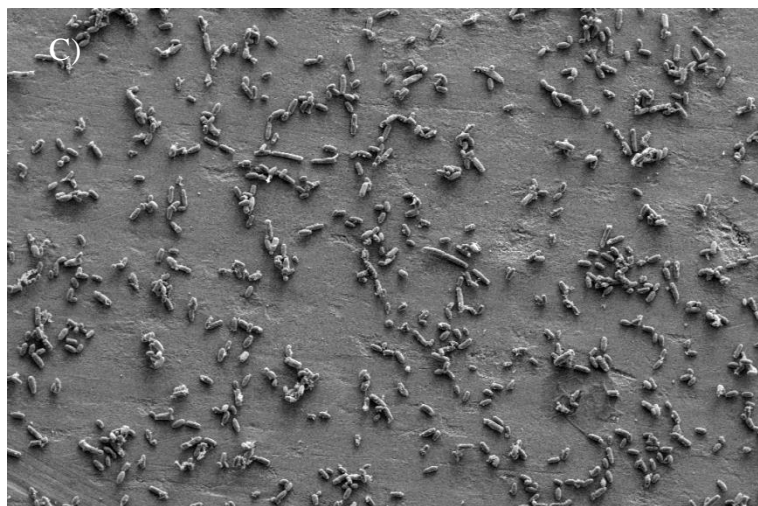
Anexo 2- Biofilm dual *C. tropicalis* y *E. coli* O157: H7 en jugo de manzana de 12 °Brix. A) 2 hs, B) 8 hs, C) 16 hs y D) 24 hs de contacto.

Anexo 2

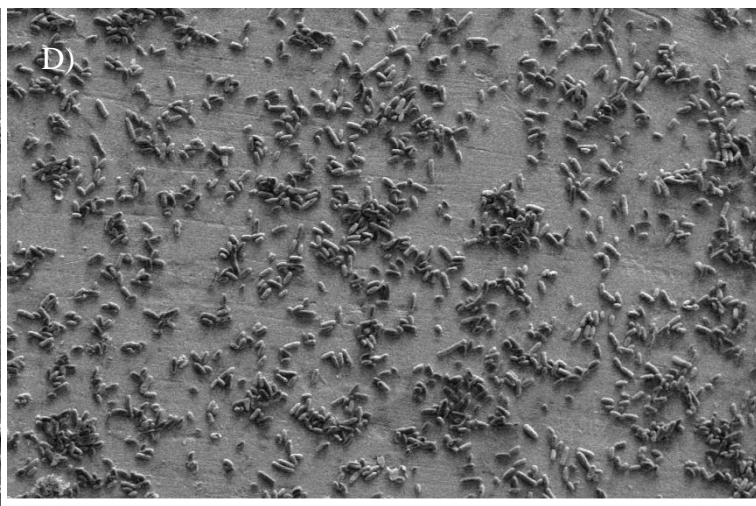
20μm⁺ Mag = 1.00 K X EHT = 7.00 kV WD = 8 mm Photo No. = 622 CCT-BB



20μm⁺ Mag = 1.00 K X EHT = 7.00 kV WD = 8 mm Photo No. = 619 CCT-BB

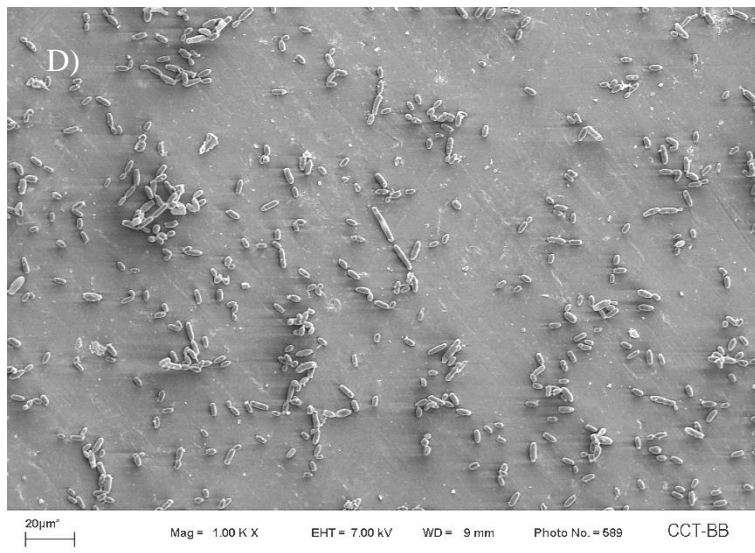
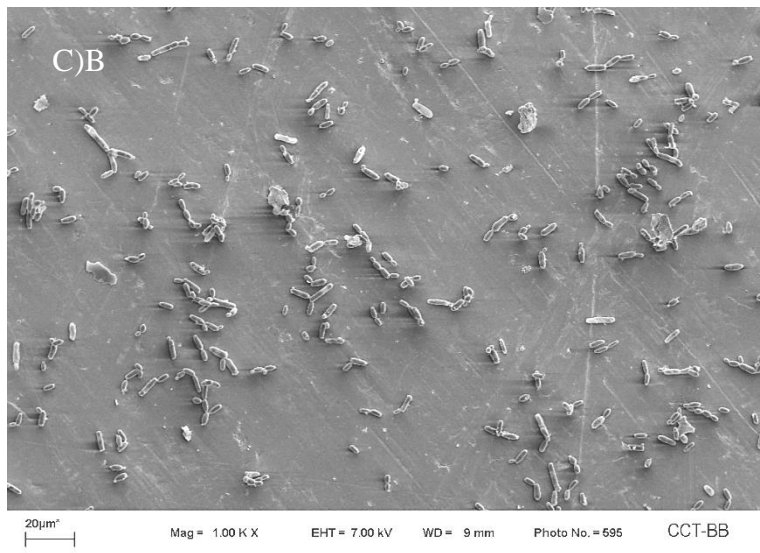
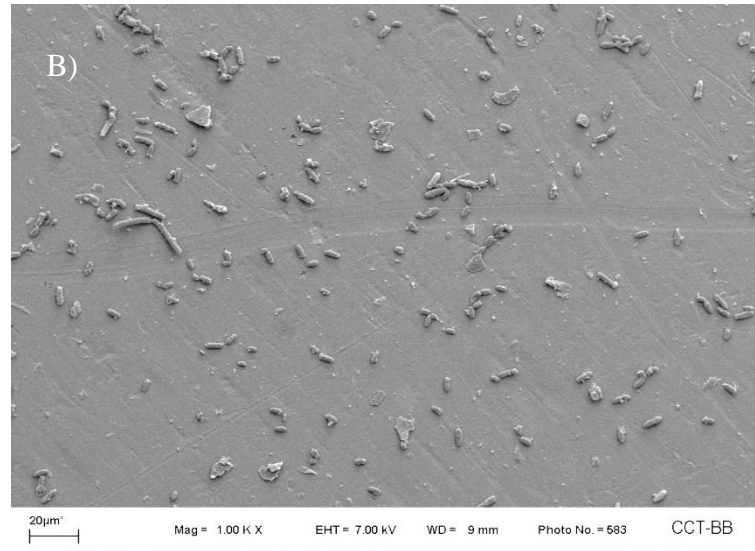
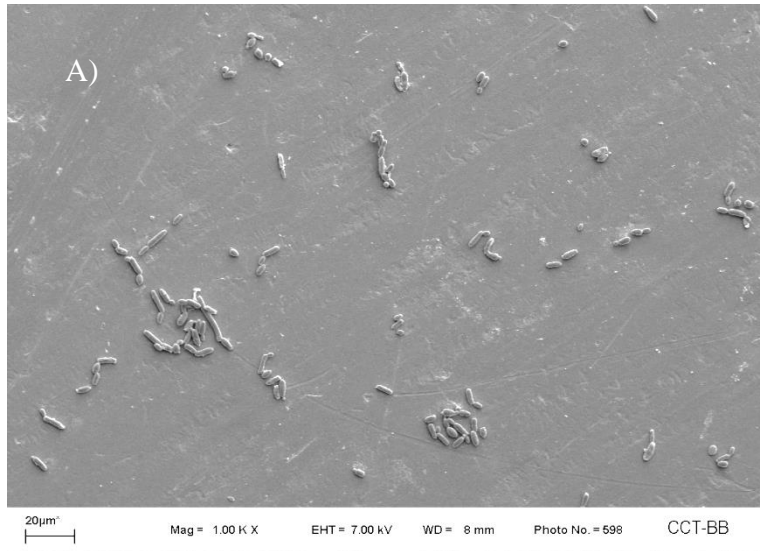


20μm⁺ Mag = 1.00 K X EHT = 7.00 kV WD = 8 mm Photo No. = 607 CCT-BB

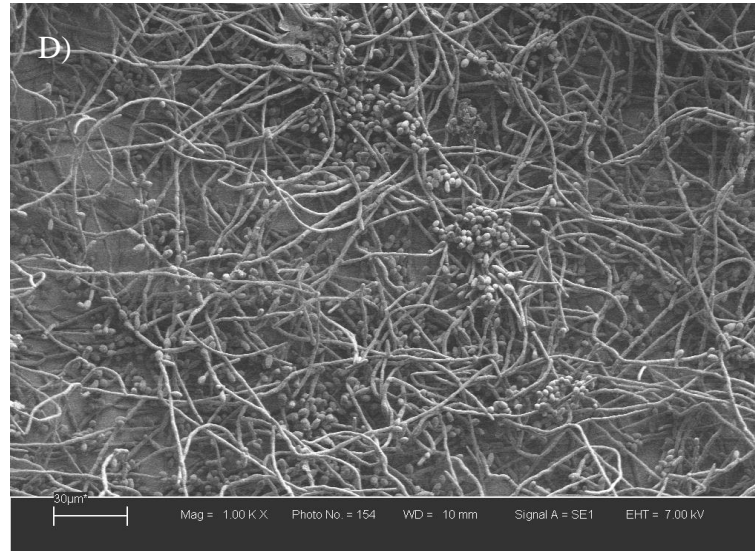
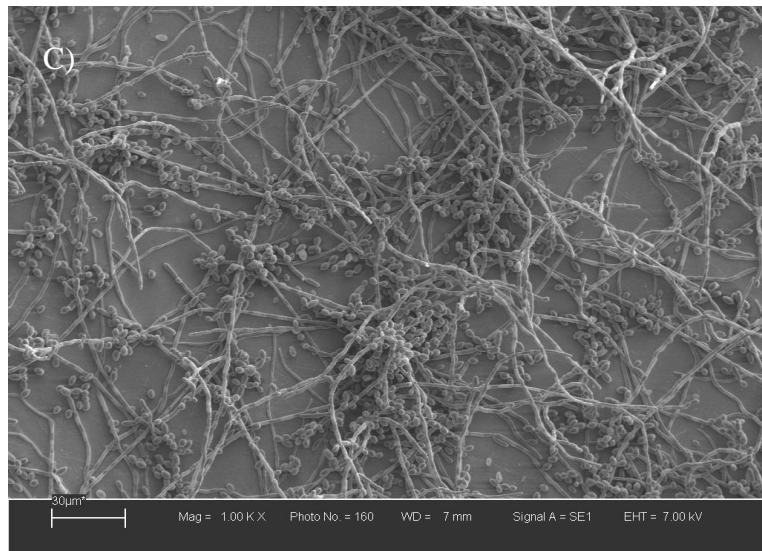
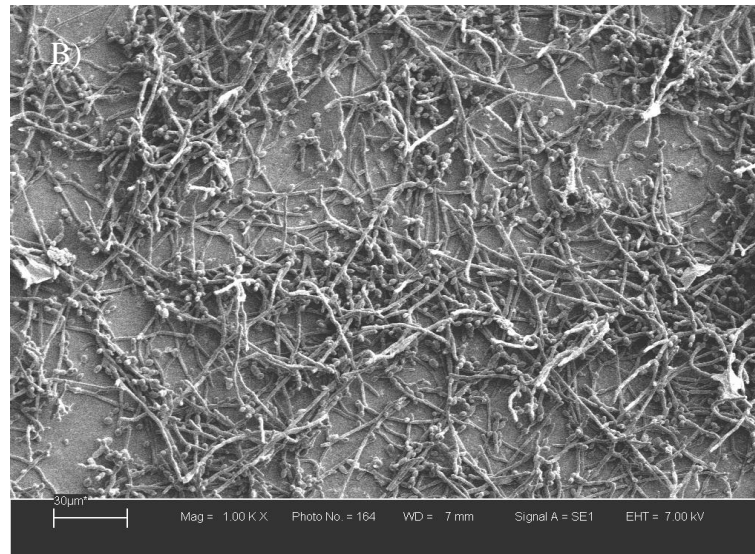
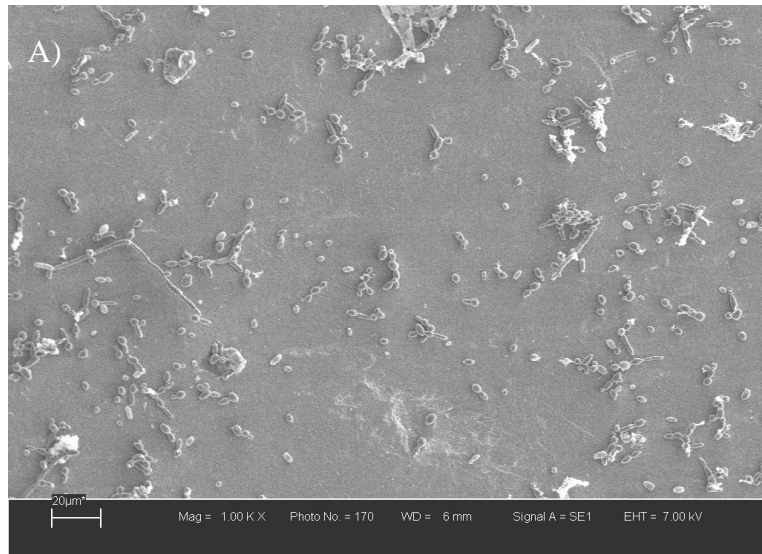


20μm⁺ Mag = 1.00 K X EHT = 7.00 kV WD = 8 mm Photo No. = 613 CCT-BB

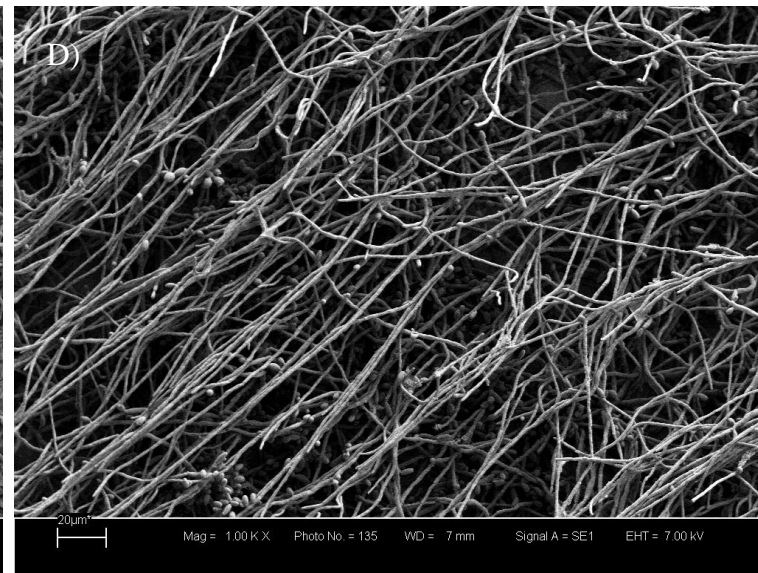
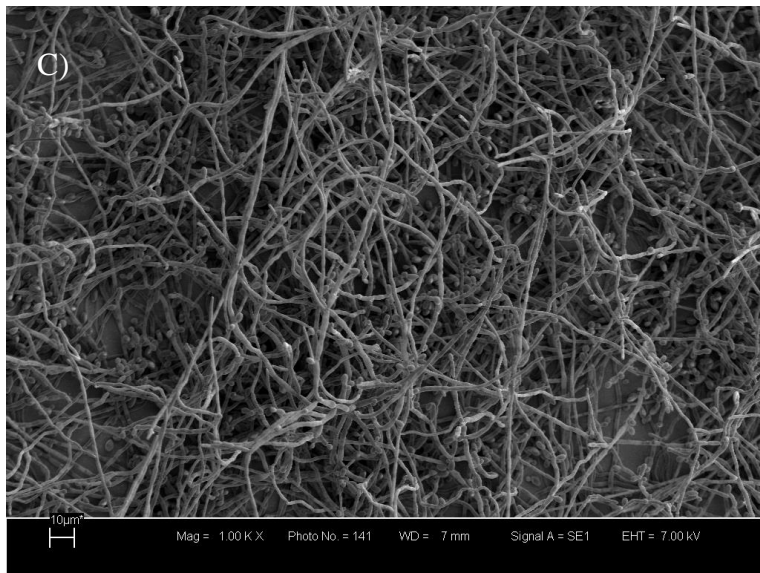
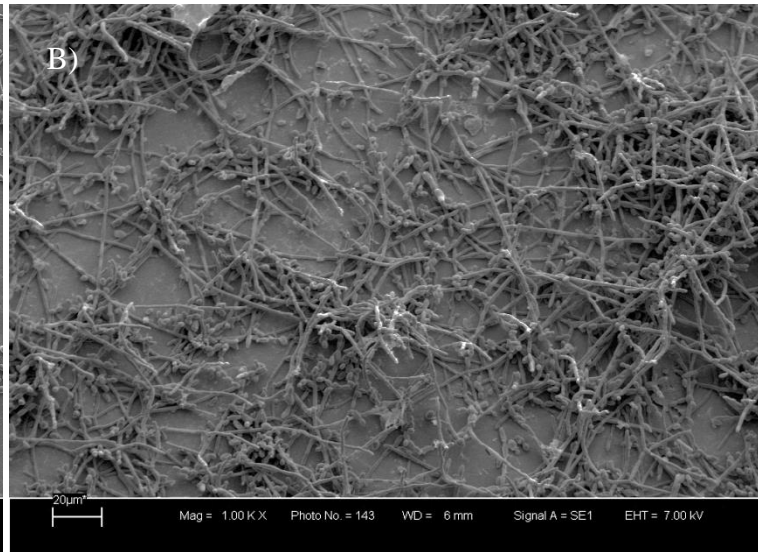
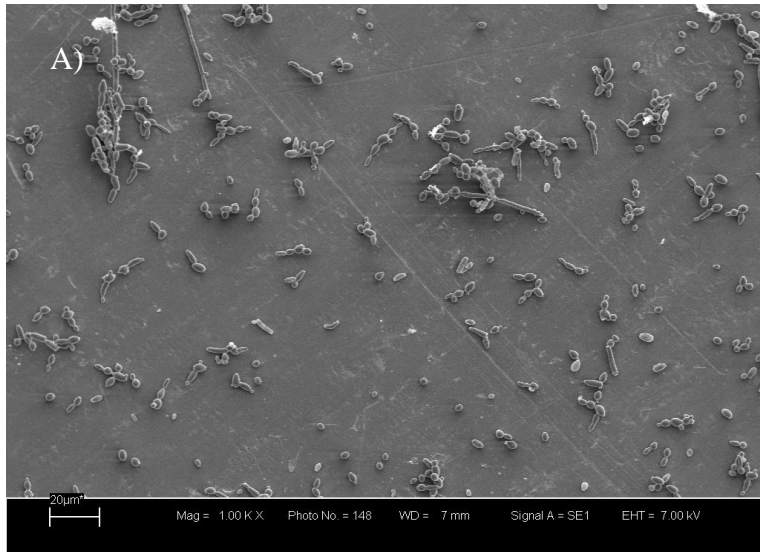
Anexo 2- Biofilm dual *C. krusei* con sobrenadantes de *Salmonella* sp. en jugo de manzana de 12 °Brix. A) 2 hs, B) 8 hs, C) 16 hs y D) 24 hs de contacto.

Anexo 2

Anexo 2- Biofilm dual *C. krusei* con sobrenadantes de *E. coli* O157:H7 en jugo de manzana de 12 °Brix. A) 2 hs, B) 8 hs, C) 16 hs y D) 24 hs de contacto.

Anexo 2

Anexo 2- Biofilm dual *C. tropicalis* con sobrenadantes de *Salmonella* sp. en jugo de manzana de 12 °Brix. A) 2 hs, B) 8 hs, C) 16 hs y D) 24 hs de contacto.

Anexo 2

Anexo 2- Biofilm dual *C. tropicalis* con sobrenadantes de *E. coli* O157:H7 en jugo de manzana de 12 °Brix. A) 2 hs, B) 8 hs, C) 16 hs y D) 24 hs de contacto.

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 con referato

- “Microestructural and rheological characterization of *in situ* yeast biofilms”. Tarifa, M.C., Genovese, D., Lozano, J.E. y Brugnioni, L.I. *Enviado Journal of Food Engineering Diciembre 2016*.
- “*Candida krusei* isolated from fruit juices ultrafiltration membranes promotes colonization of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on stainless steel surfaces”. Tarifa, M.C., Lozano, J.E. y Brugnioni, L.I. *Journal of Microbiology* (2017) 55 (2), 96-103
- “Dual-species relations between *Candida tropicalis* isolated from apple juice ultrafiltration membranes, with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* sp.” Tarifa, M.C., Lozano, J.E. y Brugnioni, L.I. *Journal of Applied Microbiology* (2015) 118 (2), 431-442.
- “*In situ* rheology of yeast biofilms”. Brugnioni, L.I., Tarifa, M.C., Lozano, J.E. and Genovese, D.B. *Biofouling* (2014) 30 (10), 1269-1279
- “Role of hydrophobicity in adhesion of wild yeast isolated from the ultrafiltration membranes of an apple juice processing plant”. Tarifa, M.C., Brugnioni, L.I. and Lozano, J.E. *Biofouling* (2013) 29 (7), 841-853.

Actas de trabajos completos en congresos internacionales

- “Efecto de las fuerzas hidrodinámicas en el desarrollo de biofilms mixtos de levaduras sobre acero inoxidable”. Tarifa, M.C., Brugnioni, L.I, Lozano, J.E. (2014). V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba, Argentina. 1er edición compendiada-Ministerio de Industria, Comercio, Minería y Desarrollo Científico Tecnológico, “Investigaciones Avances en Microbiología de los Alimentos”. ISBN: 978-987-45738-9-6

Actas de trabajos completos en congresos nacionales

➤ “Reología de biofilms mixtos de levaduras”. Tarifa, M.C., Brugnoli, L.I., Lozano, J.E. y Genovese, D.B. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina. 3 al 5 de Noviembre de 2015.

Actas de resúmenes en congresos:**Internacionales**

➤ “Formación de biofilms sobre membranas de ultrafiltración de PVDF: eficiencia del hipoclorito de sodio como agente desinfectante”. Tarifa, M.C., Lozano, J.E. y Brugnoli, L.I. (2016). XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología, XIV Congreso Argentino de Microbiología, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos, 26-30 de Septiembre, Rosario, Santa Fe. Presentado como poster.

➤ “Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de una bacteria ácido-láctica aislada de membranas de ultrafiltración de jugos de frutas sobre microorganismos patógenos de alimentos”. Tarifa, M.C., Brugnoli, L.I., Sica, M.G., Marucci, P.L y Cubitto, M.A. (2016). XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología, XIV Congreso Argentino de Microbiología, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos, 26-30 de Septiembre, Rosario, Santa Fe. Presentado como poster.

➤ “Reología de biofilms mixtos de levaduras”. Tarifa, M.C., Brugnoli, L.I., Lozano, J.E. y Genovese, D.B. (2015) Actas del XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina.

➤ “Yeast biofilm development and rheological properties on turbulent flow regimes”. Brugnoli, L.I., Tarifa, M.C., Lozano, J.E. y Genovese D.B. (2015). 6th Congress of European Microbiologists, 7-11 de Junio, Maastricht, Holanda. Presentado como poster.

➤ “Adherence to Stainless Steel of Yeast Strains Isolated from Apple Juice Processing Plants”. Lozano, J.E., Tarifa, M.C. y Brugnoli, L. (2013). BIT's 2nd World Congress of Food Science and Technology, 23-25 de Septiembre, Hangzhou, China. Presentado como póster.

➤ “Caracterización de la superficie celular de cepas productoras de biofilms aisladas de membranas de ultrafiltración”. Tarifa, M.C., Brugnoli, L.I. y Lozano, J.E. (2012). XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos, V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos, III Simposio Argentino de Conservación de

Alimentos. Buenos Aires, Argentina. 26-29 de Noviembre. Presentado como presentación oral. ISBN 978-987-26716-2-4.

Nacionales

- “Reología de biofilms mixtos de levaduras”. Tarifa, M.C., Brugnoni, L.I., Lozano, J.E. y Genovese, D.B. (2015) XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina. 3-5 de Noviembre. Presentado como presentación oral y póster.
- “Interacción simbiótica levadura/bacteria sobre superficies inertes”. Tarifa, M.C., Brugnoni, L.I. y Lozano, J.E. (2014) XIII Congreso Argentino de Micología. Buenos Aires, Argentina. 24-27 de Agosto. Presentado como E-poster.
- “Formación de biofilms mixtos de *Candida tropicalis* aislada de membranas de ultrafiltración con *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sp.”. Tarifa, M.C., Lozano, J.E. y Brugnoni, L.I. (2014) XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Córdoba, Argentina. 14-16 de Agosto. Presentado como poster.
- “Propiedades viscoelásticas lineales y no lineales de biofilms de levaduras”. Tarifa, M.C., Garrido, J.I., Brugnoni, L.I. y Lozano, J.E. (2013) XIII Congreso Argentino de Microbiología, II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina. 23-26 de Septiembre. Presentado como poster.
- “Biofilms de *Candida tropicalis* y *Candida krusei* aisladas de sistemas de ultrafiltración de una industria productora de jugo concentrado de manzana”. Tarifa, M.C., Brugnoni, L.I. y Lozano, J.E. (2013) XIII Congreso Argentino de Microbiología, II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina. 23-26 de Septiembre. Presentado como presentación oral.