

Estudio de la capacidad de formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria* spp, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157 y *Salmonella* spp en superficies en contacto con alimentos

Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria* spp, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp on food contact surfaces

Estudo da capacidade de formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria* spp, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157 e *Salmonella* spp em superfícies em contato com alimentos

Copes J¹ orcid.org/0009-0007-0571-8096, Brusa V^{1 y 2} orcid.org/0000-0003-4823-4116, Schiaffino C³ orcid.org/0009-0004-4121-060, Pellicer K¹ orcid.org/0009-0006-9891-4629

¹ Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Calle 60 y 118 La Plata (C.P. 1900) Buenos Aires, Argentina.

² Universidad Nacional de la Plata -UNLP-, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas -CONICET-); Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) UNLP, ²Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET) "Ing. Fernando N. Dulout" La Plata, Argentina.

³ Universidad Nacional de La Pampa. Facultad de Veterinarias UNLPam. Cátedra de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Calle 5 esq. 116. General Pico, La Pampa. Argentina.

Correo electrónico: jcpes@fcv.unlp.edu.ar

DOI: <https://doi.org/10.19137/cienvet.v27.9034>

Fecha de recepción del artículo: 15 de abril de 2025. **Fecha de aceptado para su publicación:** 08 de agosto de 2025

Resumen

Se realizó un estudio microbiológico en superficies, que se utilizan en la producción de alimentos listos para ser consumidos en comedores de alta producción. El objetivo de este trabajo fue



evaluar la capacidad de producir y desarrollar biopelículas en las superficies utilizadas a diario (acero inoxidable, polietileno de alta densidad y alto peso molecular y politetrafluoroetileno) incubadas a diferentes temperaturas (3, 10 y 25°C). Se realizaron las siguientes etapas: a) Aislamiento e identificación de las cepas (patógenas, patógena oportunista e indicador), b) la producción de biopelículas “*in vitro*”, c) la evaluación del tiempo de desarrollo y d) finalmente se determinó si hubo diferencias significativas entre las distintas cepas. Las 5 cepas utilizadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria* spp, *Escherichia coli*, *Escherichia. coli* O157 y *Salmonella* spp.) produjeron biopelículas en todas las superficies y en todas las temperaturas incubadas. A 3°C *Listeria* spp y *P. aeruginosa* no se observó diferencias significativas $p < 0,05$. Para *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp, se observó diferencias significativas para *E.coli* $p < 0,05$. A 10°C las cinco cepas mostraron diferencias significativas en el desarrollo $p < 0.001$. A 25°C todas las cepas mostraron diferencias significativas $p < 0,001$. Como conclusión, los resultados obtenidos indican que la ausencia o falla en el procedimiento de limpieza, genera un alto riesgo de producir Enfermedades Transmitidas por Alimentos en los consumidores

Palabras Clave: Biopelículas, Superficies, Alimentos, *Escherichia coli*, *Salmonella*

Abstract

A microbiological study was conducted on surfaces used in the production of ready-to-eat foods in high-production dining halls. The objective of this study was to evaluate the capacity to produce and develop biofilms on surfaces used daily (stainless steel, high-density, high-molecular-weight polyethylene, and polytetrafluoroethylene) incubated at different temperatures (3, 10, and 25°C). The following steps were performed: a) Isolation and identification of strains (pathogenic, opportunistic pathogen, and indicator); b) in vitro biofilm production; c) evaluation of development time; and d) finally, a determination of whether there were significant differences between the different strains. The five strains used (*Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, and *Salmonella* spp.) produced biofilms on all surfaces and at all incubation temperatures. At 3°C, *Listeria* spp and *P. aeruginosa* showed no statistically significant differences ($p < 0.05$). For *E. coli*, *E. coli* O157 and *Salmonella* spp, significant differences were observed for *E. coli* $p < 0.05$. At 10°C the five strains showed significant differences in development $p < 0.001$. At 25°C all strains showed significant differences $p < 0.001$. In conclusion, the results obtained indicate that the absence or failure in the cleaning procedure generates a high risk of producing Foodborne Illnesses in consumers

Keywords: Biofilms, Surfaces, Food, *Escherichia coli*, *Salmonella*

Resumo

Foi realizado um estudo microbiológico em superfícies utilizadas na produção de alimentos prontos para consumo em refeitórios de alta produção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produzir e desenvolver biofilmes nas superfícies utilizadas diariamente (aço inoxidável, polietileno de alta densidade e alto peso molecular e politetrafluoretileno), incubadas em diferentes temperaturas (3, 10 e 25°C). Foram realizadas as seguintes etapas: a) isolamento e identificação das cepas (patogênicas, patogena oportunista e indicadora), b) produção de biofilmes “*in vitro*”, c) avaliação do tempo de desenvolvimento e d) finalmente determinou-se se houve diferenças significativas entre as diferentes cepas. As 5 cepas utilizadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria* spp, *Escherichia coli*, *E. coli* O157 e *Salmonella* spp.) produziram biofilmes em todas as superfícies e em todas as temperaturas de incubação. A 3°C *Listeria* spp e *P. aeruginosa* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Para *E. coli*, *E. coli* O157 e *Salmonella* spp, observou-se diferenças significativas para *E. coli* $p < 0,05$. A 10°C, as cinco cepas apresentaram diferenças significativas no desenvolvimento $p < 0,001$. A 25°C, todas as cepas também apresentaram diferenças significativas $p < 0,001$. Como conclusão, os resultados obtidos indicam que a ausência ou falha no procedimento de limpeza gera alto risco de produção de Doenças Transmitidas por Alimentos nos consumidores

Palavras-chave: Biofilmes, Superfícies, Alimentos, *Escherichia coli*, *Salmonella*

Introducción

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son producidas por diferentes motivos y agentes. El término multicausalidad, es uno de los más citados para ejemplificar los múltiples eventos que pueden desencadenar una ETA ⁽¹⁾ Los agentes etiológicos responsables se clasifican en peligros biológicos, químicos y físicos. Entre los peligros biológicos, las bacterias patógenas son las que más frecuentemente involucradas. La contaminación cruzada (directa o indirecta) es una de las formas más comunes en que se contaminan los alimentos a nivel industrial, artesanal y hogareña ⁽²⁾. En la contaminación cruzada indirecta el agente contaminante se transfiere de un alimento a otro mediante algún elemento, como las manos, utensilios, tablas o equipos de cocina. Sobre los elementos que actúan de fuente de contaminación pueden permanecer restos de alimentos o que la superficie ya tenga restos orgánicos. ^(3,4) De esta manera, pueden comportarse como un nicho ecológico favorable para la adhesión, organización y formación de biopelículas ⁽⁵⁾. Las biopelículas pueden estar conformadas por microorganismos patógenos, transformándose en una fuente de contaminación constante. ⁽⁶⁾ Las contaminaciones cruzadas indirectas son un gran desafío a nivel industrial, boca de expendio minorista y en el hogar, causando enfermedades y pérdidas económicas. ⁽⁷⁾ Las biopelículas son una comunidad sésil, caracterizada por bacterias que se hallan unidas irreversiblemente a un sustrato o superficie o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular polimérica producida por ellas mismas y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes. ^(8,9)

Según Díaz ⁽¹⁰⁾ (2011) las biopelículas se pueden formar en cinco etapas, a las que denomina película acondicionante, adhesión reversible de microorganismos a la superficie, adhesión irreversible, maduración de la biopelícula. La quinta y última etapa es la de liberación o desprendimiento de células, que se alejaron de su nicho ecológico, pueden revertir a su estado planctónico y cumplir el ciclo completo. ^(11,10)

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biopelículas en superficies orgánicas (carne, alimentos en general) e inorgánicas (superficies de equipos, utensilios, etc). Esto es posible debido a las estrategias que poseen los microorganismos para poder adherirse, desarrollar, madurar y desprender bacterias o cúmulos bacterianos desde diferentes matrices como, plástico, cristal, madera, metal, materia prima y alimentos ⁽¹²⁾ Si estos sucesos no son controlados, pueden contaminar los alimentos e influir en forma directa tanto en su vida útil como en la transmisión de ETA.⁽¹³⁾ Para lograr el control de las biopelículas en los ambientes destinados a la producción de alimentos, es absolutamente necesario desarrollar “*in situ*” o “*cleaning in place*” (CiP) un sistema de limpieza y desinfección (LD) que sea efectivo, repetible y auditable. ⁽¹⁴⁾ El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de producir biopelículas de cepas aisladas de un comedor de alta producción.

Materiales y Métodos

Las cepas utilizadas en este estudio fueron aisladas a partir de superficies de polietileno de alta densidad y alto peso molecular (PEAD), máquinas de moler carne y cuchillos de un comedor de alta producción. El aislamiento de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157 (*stx*-/*eae*-), *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria* spp. se realizó de según lo recomendades en el manual Metodología Analítica Oficial. ⁽¹⁵⁾

Para los ensayos, todas las cepas fueron sembradas en 5 ml de caldo Luria Bertami (LB, Probiotek, México) y e incubadas toda la noche a 35°C. Posteriormente 0,1 ml de cada suspensión *Salmonella* spp., *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp. y *P. aeruginosa* se inoculó en la superficie del Agar XLT4 (Acumedia, Manufacturers, EE. UU.), Agar EMB (Britania, Buenos Aires, Argentina), Agar Mac Conkey con sorbitol (Britania, Buenos Aires), Agar Palcam (Acumedia, Manufacturers, EE. UU.) y Agar Cetrimide 78 (Britania, Buenos Aires, Argentina), respectivamente. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 35°C. De cada placa, se seleccionó una colonia morfológicamente característica, se sembró en caldo LB, y se incubó a 35°C durante 24 horas. El inóculo que se utilizó para el experimento fue 1 ml de una concentración bacteriana 10^3 - 10^4 UFC/ml. ⁽¹⁶⁾

Las superficies sobre las que se evaluó la capacidad de formación de biopelículas fueron: acero inoxidable (AI), teflón (PTFE) y PEAD. Se utilizaron porciones de 1,5 x 1,5 cm. Estas superficies se obtuvieron a partir de bandejas de servicio del comedor de AI, contenedores de producto terminado de PEAD y tablas de corte de PTFE. Las superficies a estudiar se colocaron en tubos de vidrio de 22 mm de ancho y se mantuvieron 48 horas a las temperaturas fijadas (3, 10 y 25°C). Luego se inoculó 10 ml del inóculo en cada caso.

Se realizaron incubaciones de las cepas a diferentes temperaturas para las 3 superficies. *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. y se incubaron a 3°C durante 3, 6, 12, 48, 72, 96, 120 y 192 horas (n=

48). *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. se incubaron a 3°C durante 12, 24, 48, 72, 96, 144, 192 y 240 horas (n=72). Asimismo, todas las cepas se incubaron a 10°C durante 3, 6, 12, 24, 48, 96, 144 y 192 horas (n=120) y a 25°C durante 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas (n=120).

Luego de la incubación, cada superficie se colocó en un tubo con 10 ml de solución fisiológica (SF) y se realizaron 4 lavados de 15 segundos con un agitador vortex modelo 6005 (Vicking, Buenos Aires, Argentina). La superficie fue extraída con pinza Kocher e hisopada en ambas caras utilizando dos hisopos. Los hisopos fueron colocados en SF y se realizaron diluciones seriada en base 10. Se sembró 0,1 ml del inóculo (dilución 4×10^3) en la superficie del medio ARP (ANMAT, 2014), previo pasaje por vortex^(17,18,19)

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018).⁽²⁰⁾ Se empleó un nivel de significación de $p < 0.05$. Se utilizó el análisis de varianza para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de los recuentos obtenidos por todas las cepas con respecto a cada una de las temperaturas (3, 10 y 25°C).

Resultados

1.1. *P. aeruginosa* y *Listeria* spp a 3°C.

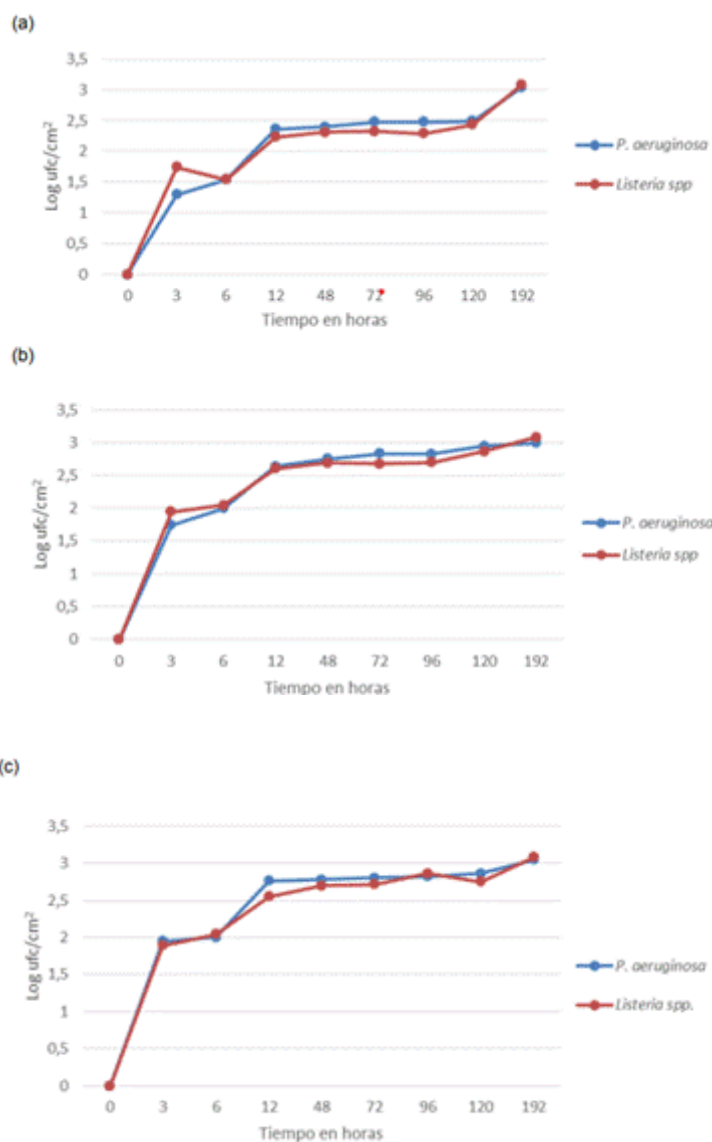
En las superficies de AI, *P. aeruginosa* mostró la menor concentración a las 3 horas (1,3 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,04 log UFC/cm²) y *Listeria* spp. registró la menor concentración a las 3 horas (1,74 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,08 log UFC/cm²) (Figura 1 a).

En las superficies PEAD, *P. aeruginosa* mostró la menor bacteriana a las 3 horas (1,74 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (2,99 log 96 UFC/cm²) y *Listeria* spp. registró la menor concentración a las 3 horas (1,94 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,07 log UFC/cm²) (Figura 1b).

En las superficies PTFE, *P. aeruginosa* mostró la menor bacteriana a las 3 horas (1,64 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,04 log UFC/cm²) y *Listeria* spp. registró la menor concentración a las 3 horas (1,89 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas de incubación (3,08 log UFC/cm²) (Figura 1c).

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

Figura 1: Valores obtenidos a partir de los recuentos de *P. aeruginosa* y *Listeria* spp. en AI (a), PEAD (b) y PTFE (c) a 3°C



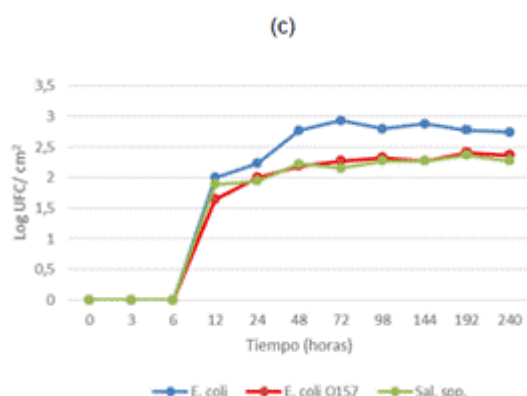
1.2. *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. a 3°C

En las superficies de AI, *E. coli* mostró la menor concentración a las 12 horas (2,04 log UFC/cm²) y la mayor a las 96 y 240 horas de incubación (2,79 log UFC/cm²). La menor concentración para *Salmonella* spp se observó a las 24 horas (1,89 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 192 horas de incubación (2,27 log UFC/cm²). Para *E. coli* O157, la menor concentración fue a las 12 horas (1,64 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 192 horas (2,27 log UFC/cm²) (Figura 2a).

En las superficies PEAD, *E. coli* mostró la menor concentración a las 12 horas (2,12 log UFC/cm²) y la mayor a las 72 horas (2,93 log UFC/cm²) decreciendo hasta las 240 horas de incubación (2,76 log UFC/cm²). Para *Salmonella* spp la menor concentración fue a las 12 horas (1,34 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 144 horas (2,30 log UFC/cm²) decreciendo a las 240 horas (2,17 log UFC/cm²). Para *E. coli* O157, la menor concentración fue a las 12 horas (1,64 log UFC/cm²) y la mayor a las 192 horas (2,17 log UFC/cm²) (Figura 2b). En las superficies PTFE, *E. coli* mostró la menor concentración bacteriana a las 12 horas (2 log UFC/cm²) y la mayor a las 72 horas (2,93

log UFC/cm²) decreciendo a las 240 horas de incubación (2,74 log UFC/cm²). Para *Salmonella* spp. la menor concentración fue a las 12 horas (1,89 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 192 horas (2,27 log UFC/cm²). Para *E. coli* O157 la menor concentración fue a las 12 horas (1,64 log UFC/cm²) y la mayor fue a las 192 horas de incubación (2,36 log UFC/cm²) (Figura 2c). La formación de biopelículas de *E. coli*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 a 3°C durante 240 horas, mostró diferencias significativas en los promedios de los recuentos para *E. coli* en las superficies de AI y PEAD a las 48, 72, 96, 144 y 240 horas de incubación ($p<0,05$). En el desarrollo de biopelículas de *E. coli*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 a 3°C durante 240 horas sobre PTFE, *E. coli* mostró diferencias significativas en los promedios de recuentos a las 48, 72, 96, 144, 192 y 240 horas de incubación ($p<0,05$).

Figura 2: Valores obtenidos a partir de los recuentos de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. en AI (a), PEAD (b) y PTFE (c) a 3°



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

Sobre las superficies de AI, los valores obtenidos a las 3 horas de incubación se encontraron dentro del mismo ciclo logarítmico (2,00 log UFC/cm²). *Salmonella* spp y *E. coli* mostraron las concentraciones bacterianas más bajas (2,04 y 2,34 log UFC/cm² respectivamente) y en contraposición, *E. coli* O157 mostró la mayor concentración (2,93 log UFC/cm²) (Figura 3a, Figura 4).

En las superficies PEAD, las concentraciones de *E. coli* y *E. coli* O157 (>3,26 log UFC/cm²) superaron los 3,00 log UFC/cm². Las mayores concentraciones bacterianas las alcanzaron *E. coli* O157 y *Salmonella* spp (6,20 y 6,02 log UFC/cm² respectivamente) a partir de las 48 horas. *Listeria* spp y *P. aeruginosa* superaron los 5,00 log UFC/cm² a partir de las 96 horas, al mismo tiempo, *E. coli* llegó a la mayor concentración (4,89 log UFC/cm²) (Figura 3b).

En las superficies PTFE, las concentraciones de *E. coli* y *E. coli* O157 superaron los 3,00 log UFC/cm² (>3,26 log UFC/cm²). Las mayores concentraciones bacterianas fueron para *E. coli* O157 y *Salmonella* spp (6,25 y 6,06 log UFC/cm² respectivamente) a partir de las 48 horas. *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 superaron los 5,00 log UFC/cm² a partir de las 96 horas, al mismo tiempo, *E. coli* y *Listeria* spp llegaron a la mayor concentración (4,92 y 4,95 log UFC/cm² respectivamente) (Figura 3c).

Figura 3: Valores obtenidos a partir de los recuentos de *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. en AI (a), PEAD (b) y PTFE (c) a 10°C.

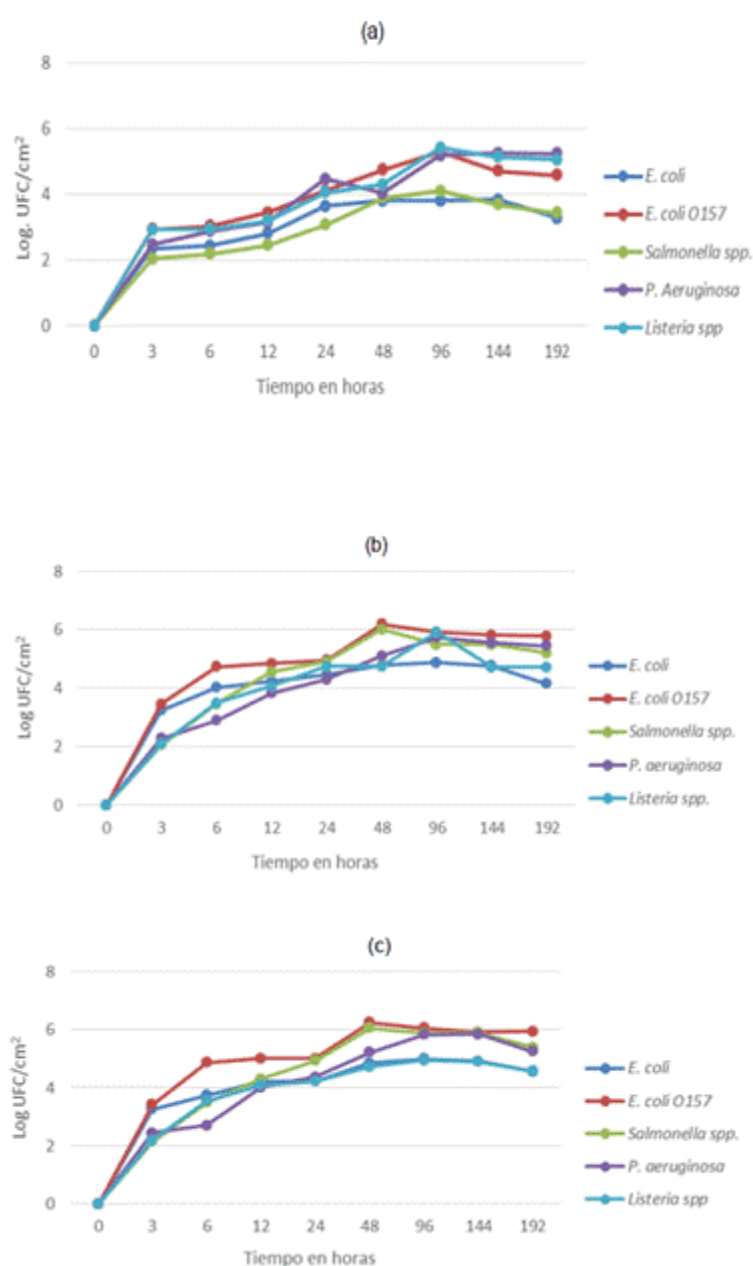


Figura 4. Biopelícula en acero inoxidable de *Salmonella* spp. después de 96 horas de incubación a 10°C (5,41 log UFC/cm²).



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

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

En las superficies de AI, a las 3 horas la mayor concentración se registró para *E. coli* O157 (5,03 log UFC/cm²), seguido por *P. aeruginosa* (4,44 log UFC/cm²) y *E. coli* con 3,60 log UFC/cm². La mayor concentración bacteriana fue de *E. coli* O157 (7,92 log UFC/cm²) a las 36 horas, seguido por *E. coli* (6,73 log UFC/cm²), *P. aeruginosa* (5,93 log UFC/cm²) (Figura 5) y *Salmonella* spp (5,91 log UFC/cm²). *Listeria* spp alcanzó la mayor concentración a las 48 horas (7,00 log UFC/cm²) (Figura 6a).

En las superficies PEAD, la mayor concentración a las 3 horas fue de *P. aeruginosa* (5,04 log UFC/cm²) y *E. coli* O157 (5 log UFC/cm²). La mayor concentración fue alcanzada por *E. coli* O157 (7,77 log UFC/cm²) a las 48 horas, seguido por *E. coli* (7,63 log UFC/cm²). *P. aeruginosa*, *Listeria* spp y *Salmonella* spp no superaron el valor de 6,81 log UFC/cm² (Figura 6b).

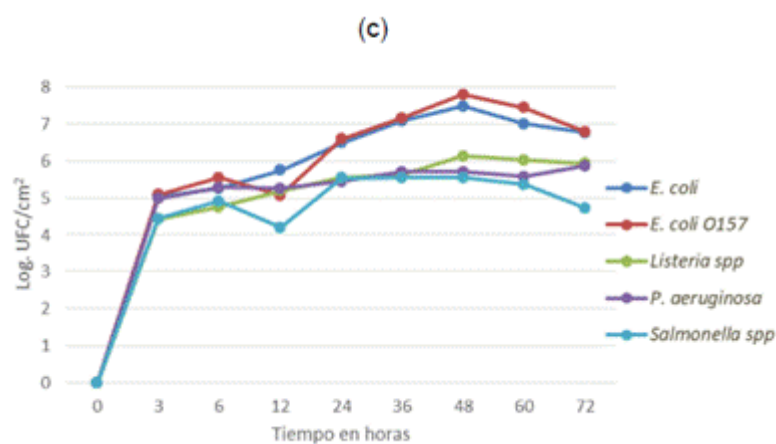
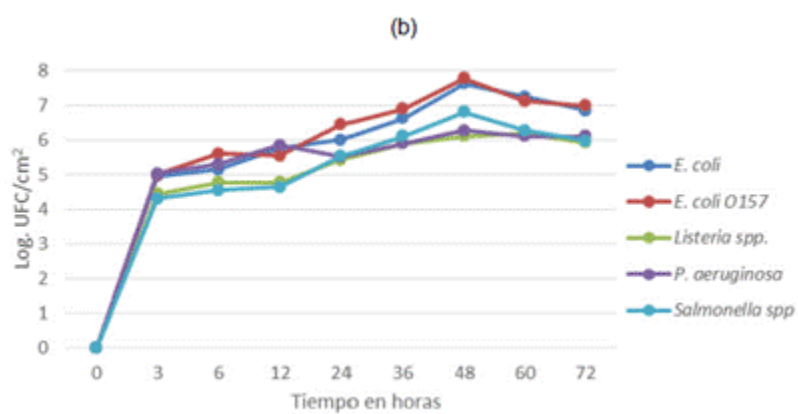
En el caso de las superficies PTFE, la mayor concentración a las 3 horas fue de *E. coli* O157 (5,08 log UFC/cm²) seguida por *E. coli* (5,04 log UFC/cm²). Las mayores concentraciones bacterianas fueron alcanzadas a las 48 horas por *E. coli* O157 (7,79 log UFC/cm²) y *E. coli* (7,48 log UFC/cm²). *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. no alcanzaron el valor de 6,00 log UFC/cm². *Listeria* spp. alcanzó la mayor concentración a las 48 horas (6,13 log UFC/cm²) (Figura 6c).

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

Figura 5: Biopelícula de *P. aeruginosa* incubada a 25°C, después de 36 horas de incubación (5,93 log UFC/cm²).



Figura 6: Valores obtenidos a partir de los recuentos de *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. en AI (a), PEAD (2) y PTFE (c) a 25°C.



Discusión

Todas las cepas (*E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria* spp, *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp) estudiadas en este trabajo, mostraron que pudieron adherirse y desarrollar biopelículas en las diferentes superficies (AI, PEAD y PTFE) y en las 3 temperaturas experimentadas (3, 10 y 25°C). En la incubación a 3°C de temperatura, las cepas de *Listeria* spp. y *P. aeruginosa* se adhirieron a las 3 superficies a las 3 horas de incubación y formaron biopelículas con concentraciones de 2,99 y 3,08 log UFC/cm² a las 192 horas (8 días). El desarrollo de estas especies en las condiciones empleadas fue muy similar y no se obtuvieron diferencias significativas $p < 0,05$. Villanueva *et al.*, (2017)⁽²¹⁾ trabajaron sobre 14 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de queso y comprobaron que el 64,5% produjeron biopelículas. Di Bonaventura *et al.*, (2008)⁽²²⁾ obtuvieron biopelículas de 44 cepas de *L. monocytogenes* a 4°C en AI, plástico y vidrio, obteniendo una diferencia significativa en el vidrio. Moltz *et al.*, (2005)⁽²³⁾ informaron una concentración de 105 UFC/6,45 cm² en AI a 4°C durante 4 días.

Estos microorganismos sobreviven y se adaptan en medio ambiente extremo y muchos de ellos están dotados con la capacidad de producir biopelículas, ⁽²⁴⁾ *Pseudomonas* es una especie bacteriana que en condiciones aeróbicas y en bajas temperaturas produce un marcado deterioro en los alimentos. ^(25,26) Asociada a esta, *Listeria* spp forma biopelículas mixtas que le confieren un aumento en el riesgo de producir ETA. ^(27,28)

Las cepas de *E. coli*, *E. coli* O157 y *Salmonella* spp en todas las superficies y a 3°C, se adhirieron a partir de las 12 horas en los dos primeros casos (*E. coli*, *E. coli* O157) y a las 24 horas en el tercero (*Salmonella* spp). La mayor concentración bacteriana fue alcanzada por *E. coli* (2,79 UFC/cm²) a las 240 horas (10 días) de incubación. El comportamiento de las bacterias coliformes evaluadas en este estudio fue muy similar a los datos consultados en la bibliografía. Varios autores realizaron diferentes ensayos para producir biopelículas a bajas temperaturas y en diferentes matrices. En AI, Dantas Espadas *et al.*, (2014)⁽²⁹⁾, desarrollaron biopelículas de *E. coli* O157 en 144 horas incubando a 6°C, y obtuvieron una concentración bacteriana de 3 log UFC/cm². Dourou *et al.*, (2011),⁽³⁰⁾ utilizaron trozos de AI y de PEAD pegados a la superficie que contuvo la carne molida inoculada con *E. coli* O157 que fueron incubados a 4°C. El resultado que obtuvieron fue de 2,5 log UFC/cm² (con la carne molida) a las 168 horas (7 días) de incubación.

Recientemente Borges *et al.*, (2018)⁽³¹⁾ estudiaron la capacidad de producir biopelículas a partir 243 cepas de *Salmonella* entérica, de las cuales 96 cepas (39,5%) produjeron biopelículas a 3°C, demostrando que *Salmonella* spp tiene la capacidad de producir biopelículas en diferentes superficies y a bajas temperaturas.

La formación de biopelículas de *E. coli*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 a 3°C durante 240 horas, mostró diferencias significativas en los promedios de los recuentos para *E. coli* en las superficies de AI y PEAD a las 48, 72, 96, 144 y 240 horas de incubación ($p < 0,05$). Sobre PTFE, *E. coli* mostró diferencias significativas en los promedios de recuentos a las 48, 72, 96, 144, 192 y 240 horas de incubación ($p < 0,05$). El comportamiento observado en *Listeria* spp, *Salmonella* spp y *E. coli* O157 a bajas temperaturas en superficies inertes, fue de gran relevancia para entender que la

contaminación de alimentos listos para ser consumidos puede suceder con facilidad y poner en riesgo la salud de los consumidores. ^(32, 26,33)

En la incubación a 10°C de temperatura, las 5 cepas se adhirieron en las 3 superficies en las 3 primeras horas de incubación. La mayor concentración celular fue de *E. coli* O157 (PEAD, 3,45 log UFC/cm²) y la menor fue de *Salmonella* spp (AI, 2,04 log UFC/cm²). A lo largo de la incubación (192 horas, 8 días) la mayor concentración bacteriana alcanzada fue en PTFE por *E. coli* O157 (6,25 log UFC/cm²). Los resultados obtenidos mostraron similitud con trabajos publicados por otros investigadores. De hecho, existen publicaciones donde se informó el desarrollo de biopelículas de diferentes especies microbianas en AI, vidrio, gomas y diferentes plásticos. ^(31,22) a temperaturas entre 8 y 12°C y dentro de los 8 y 10 días. A esta temperatura, las cepas presentaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en los promedios de los recuentos bacterianos, en todos los tiempos de lectura y en todas las superficies estudiadas.

Según los resultados obtenidos a 10°C, se dedujo que las concentraciones bacterianas alcanzadas por las biopelículas, fue uno de los eventos más importantes en relación con la inocuidad de los productos. ⁽²⁶⁾ Las cepas de *E. coli* O157, *Listeria* spp y *Salmonella* spp superaron sus respectivas dosis infectivas mínimas (DIM). Cabe recordar que la DIM de *E. coli* O157:H7 puede ser de 10 hasta 100 UFC y de *Salmonella* spp de 10⁵ a 10⁸ UFC/g, pudiendo variar según las características de la cepa y la resistencia del huésped ^(7, 36 9)

La capacidad de producir biopelículas de las tres cepas estudiadas aumenta el riesgo de contaminación cruzada indirecta en los alimentos. Es importante resaltar que sin un protocolo de sanitización que tenga en cuenta la diseminación por aerosoles, el riesgo de producir enfermedad a los manipuladores se elevaría drásticamente. Estos sucesos son de suma importancia al momento de llevar a cabo un sistema de gestión de la inocuidad. ⁽³⁷⁾

En la incubación a 25°C de temperatura, las 5 cepas se adhirieron a las 3 superficies en las 3 primeras horas de incubación. La mayor concentración se observó en PEAD por *E. coli* O157 (3,45 log UFC/cm²) y la menor concentración fue por *Salmonella* spp en AI (2,04 log UFC/cm²). A lo largo de toda la incubación (72 horas) la mayor concentración bacteriana alcanzada fue en AI por *E. coli* O157 (7,92 log UFC/cm²). Estos datos coinciden con la bibliografía consultada. ^(38,39) A temperatura 25°C los microorganismos patógenos utilizados superaron la dosis infectiva mínima en un tiempo de 3 horas y formaron biopelículas en los materiales ensayados.

Estos datos fueron de gran importancia para implementar protocolos dirigidos a la prevención en la formación de biopelículas y cumplir con el objetivo de minimizar los riesgos de contaminación cruzada. ⁽⁴⁰⁾ En los lugares donde se realiza la cocción, las temperaturas pueden elevarse más allá de los 38°C, estas condiciones favorecen todas las etapas de formación de una biopelícula en muy corto tiempo. Los utensilios que son utilizados con materia orgánica y no son lavados y desinfectados, pueden dar lugar a una película acondicionante. ⁽¹⁰⁾ y favorecer el desarrollo de una biopelícula. Desde el momento que se afirmó que estas estructuras microbianas podían tener el rol de un reservorio infeccioso, ⁽¹⁴⁾ la industria alimentaria incrementó esfuerzos para obtener una mejora continua en los sistemas de gestión de la inocuidad. Los procedimientos denominados *cleaning in place* (CiP), ^(35,41,14) se basan en una minuciosa aplicación de limpieza y desinfección en un lugar definido y con personal altamente capacitado. Son verificados con controles macroscópicos y con métodos microbiológicos, ejecutados con estrictas frecuencias

(sujetas a la aparición de desviaciones). En caso de presentarse no conformidades se procede a la aplicación de acciones correctivas. ^(41,42,43)

Consideramos importante hacer una referencia sobre características de los materiales que fueron utilizados en este experimento. Los trozos de Al (obtenidos de bandejas en uso), PEAD (contenedores en uso) y PTFE (tablas de corte en uso), poseían ralladuras y marcas que se detectaban macroscópicamente. Estas rugosidades influyeron para que el material orgánico quede retenido facilitando así la adhesión bacteriana. ^(42, 10) Todos los materiales que se utilizan en producción de alimentos deben estar habilitados por las instituciones específicas que verifican su constitución y vida útil, esto debe ser considerado uno de los aspectos esenciales para una planta procesadora de alimentos. Por lo expuesto, la redacción de procedimientos que indiquen las condiciones límites del uso de las superficies es una de las acciones a implementar con rapidez para prevenir futuros problemas en la sanitización. Los resultados obtenidos en esta etapa se convierten en información indispensable para poder implementar una estrategia para el control de las biopelículas y de esa manera obtener productos inocuos para la sociedad.

Conclusiones

Las cepas aisladas de las superficies que están en contacto con los alimentos pueden producir biopelículas en otras superficies, si encuentran las condiciones extrínsecas necesarias. A bajas temperaturas las 5 cepas se adhirieron y formaron una biopelícula con baja concentración bacteriana (cercana a 3 log), pero se mantuvieron durante 240 horas.

La cepa *E. coli* que mostró diferencias significativas $p < 0,05$, fue aislada de un contenedor de PEAD, que era utilizado para guardar materia prima en la cámara.

Las cepas patógenas superaron las dosis infectivas mínimas en las primeras 3 horas.

Bibliografía

1. ASSAL. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. 2023. <https://www.assal.gov.ar/eta/>
2. Torres J, Voisier A, Berríos I, Pitto N, Durán Agüero. 2018. Conocimiento y aplicación en prácticas higiénicas en la elaboración de alimentos y auto-reporte de intoxicaciones alimentarias en hogares chilenos. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000500483>
3. Copes J. 2019. Tesis Doctoral. UNLP. <https://doi.org/10.35537/10915/88776>
4. Kirchner M, Rebecca M, Goulter B, Chapman J, Claytonn J, Jaykus L. 2021. Cross-Contamination on Atypical Surfaces and Venues in Food Service Environments. *Journal of Food Protection*. 84(7): 1239-1251.
5. Fernández-Gómez P, Prieto M, Fernández-Escámez PS, López M, Alvarez-Ordóñez A. 2020. Biopelículas y persistencia microbiana en la industria alimentaria. *Arbor*. 196 (795): a538.
6. Ortega-Peña S, Hernández-Zamora E. 2018. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462018000200079
7. ANMAT. 2018. Enfermedades transmitidas por alimentos. Ficha técnica nº9: Salmonelosis. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/salmonelosis.pdf>
8. Donlan R. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9):881-90.
9. Jong-Hui Kim, Eun-Seon Lee, Kyoung-J Song, Bu-Min Kim, Jun-Sang Hamg, Mi-Hwa Oh. 2022. Development of Desiccation-Tolerant Probiotic Biofilms Inhibitory for Growth of Foodborne Pathogens on Stainless Steel Surfaces. *Foods*. 11(6),831.
10. Diaz C. 2011. Tesis Doctoral. UNLP. <http://hdl.handle.net/10915/2685>.
11. Campuzano S, Jiménez L, Hernández DM. 2017. La formación de biopelículas y la calidad del agua en la consulta odontológica. *NOVA*. 2018; 16 (29): 39-49.
12. Vidal E. 2014. Formación de biofilms bacterianos sobre distintas superficies de implantes dentales. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/36302>
13. Gunduz G, Tuncel G. 2006. Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006; 89(3-4):329-36.
14. Shi X, Zhu X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*. Volume 20, Issue 9, 407-413
15. Renaloea 2011. Metodología Analítica Oficial. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.anmat.gob.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf
16. Silagyi K. 2009. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19465248/>
17. Azeredo J, Azevedo N, Briandet R, Cerca N, Coenye T., Costa A. 2017. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*. 43 313–351.

18. Instituto de Salud Pública. 2008. Gobierno de Chile. Procedimiento Recuento De Microorganismos En Suspensión Por método De Torunda En Superficie. <https://vdocuments.net/torundas.html>
19. Li L, Mendis N, Trigui H. 2014. The importance of the viable but non-culturable state inhuman bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 5:258.
20. Di Rienzo, M., Di Rienzo, G. D., & Di Rienzo, J. A. (2018). InfoStat: Software para análisis estadístico. [InfoStat](#)
21. Villanueva D, Salazar M. 2017. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh cheese of markets in Cercado de Lima. *Anales de la Facultad de Medicina*. 78(3): 322-325.
22. Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D'Orio V, Vergara A, Conter M, Lanieri A. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*. 104(6):1552-61.
23. Moltz A, Martin S. 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*. 68(1):92-7.
24. Xinzhe Gu, Ye Sun, Kang Tu, Qingli Dong, Leiying Pan. 2016. Predicting the growth situation of *Pseudomonas aeruginosa* on agar plates and meat stuffs using gas sensors. *Scientific Reports*. Nature. 6: 38721.
25. Domínguez Aragón A, Olmedo Martínez J, Hernández C, Escobar A, Zaragoza Contreras EA. 2017. Sensor colorimétrico para el monitoreo del deterioro del pescado. 9º Congreso Internacional de Investigación Científica Multidisciplinaria ICM 2017 <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/1819/1/CONGRESO%20ITSM%20Angy22.pdf>
26. Periago M, Santaella M, Martínez-Graciá M, Navarro-González I, Puche C. 2016. Indicadores De Calidad Sanitaria Y Del Deterioro En Filetes De Dorada (*Sparus aurata*) Refrigerados Sometidos A Un Tratamiento De Agua Ozonizada Y Sal De Glicina. *Anales de Veterinaria de Murcia*. 32: 45-58 (2016).
27. Desai AN, Anyoha A, Madoff LC, Lassmann B. 2019. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: a review of ProMED reports from 1996 to 2018. *International Journal of Infectious Diseases*. 84: 48.
28. Hernández Puga, C. 2016. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/38812/>
29. Dantas Espadas V, Morales Capelo A, Martínez Barrio M. 2014. Supervivencia patógenos en superficies de acero inoxidable en extractos vegetales. XXIII Jornadas Nacionales De Seguridad Alimentaria. Adeje (Tenerife) 7, 8 y 9 de Mayo 2014. <http://www.jornadasavesa.com/index.php/navarra/itemlist/category/137-jornadas-tenerife>
30. Dourou D, Beauchamp C, Yoon Y, Geornaras I, Belk K, Smith G, Nychas G, Sofos J. 2011. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology*. 149(3):262-8
31. Borges K. 2018. Capacidade de produção de biofilme por cepas de diferentes sorovares de *Salmonella* em quatro temperaturas de incubação. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 38 (1): 71-76.

32. Santos T, Viala D, Chambon E, Esbelin J, Hébraud H. 2019. *Listeria monocytogenes* Biofilm Adaptation to Different Temperatures Seen Through Shotgun Proteomics. *Frontiers in Nutrition*. 6: 89.
33. Aryal M, Muriana P. 2019. Efficacy of Commercial Sanitizers Used in Food Processing Facilities for Inactivation of *Listeria monocytogenes*, *E. Coli* O157:H7, and *Salmonella* Biofilms. *Foods*. 8(12), 639. <https://doi.org/10.3390/foods8120639>
34. Dantas STA, Rossi F, Bonsaglia E, Castilho E, Hernandez T, Fernandes A, Rall T. 2018. Cross-Contamination and Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis on Various Cutting Boards. *Foodborne Pathogens and Disease*. 15(2):81-85
35. Bonsaglia E, Silva N, Fernades Júnior A, Araújo Júnior F, Tsunemib M, Rall V. 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures *Food Control*. 35 (1): 386-391.
36. Hernández Puga, C. 2016. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/38812/>
37. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2018. Scientific opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*. 16: 173.
38. Isequilla H. 2018. Trabajo de Especialización. UNLP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/76494>
39. Barreto M, Castillo-Ruiz M, Retamal P. 2016. *Salmonella* entérica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*. 33: 5.
40. López Aguayo M, Grande Burgos M, Lucas López R, Gálvez A. 2010. Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 23: 121-136
41. Schiaffino, C. 2021. Introducción Al Análisis De Peligros Y Puntos Críticos De Control SENASA. <http://www.cvpconosur.org/wp-content/uploads/2021/06/PresentacionSchiaffinoHACCPmayo2021.pdf>
42. Ábalos C. Adhesión bacteriana a biomateriales. *Av Odontoestomatol* vol.21 no.1 Madrid. 2005.

Declaración de conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones, que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

CRedit:

Todos los autores contribuyeron a la concepción y el diseño del estudio: preparación del material, la recopilación y el análisis de datos. El primer borrador del manuscrito fue escrito por Julio Copes y todos los autores comentaron las versiones anteriores del manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final. Supervisión: Julio Copes