

Efecto de la solución de hipoclorito de sodio en la formación de biopelículas microbianas

Sobeida Carolina Castro Espinoza

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de la solución de hipoclorito de sodio en la formación de biopelículas microbianas

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Sobeida Carolina Castro Espinoza

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Efecto de la solución de hipoclorito de sodio en la formación de biopelículas microbianas

Sobeida Carolina Castro Espinoza

Resumen. La desinfección es una herramienta clave para garantizar la inocuidad alimentaria. El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de la solución de cloro y el tiempo de contacto para reducir la formación de biopelícula de tres microorganismos diferentes y comparar la eficacia del desinfectante en bacterias adheridas y bacterias suspendidas. Para la realización del estudio se determinó la capacidad de formar biopelícula de tres microorganismos diferentes que causan el deterioro de los alimentos: *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* bajo el tratamiento de una solución de cloro de 25 ppm en intervalos de 5, 15 y 30 minutos. El diseño experimental usado fue Bloques Completos al Azar con medidas repetidas en el tiempo. Se realizaron recuentos para células sésiles en Log UFC/cm² y en Log UFC/ml en la formación de biopelícula. Se analizaron las relaciones entre métodos y tratamientos por tiempo para la cuantificación de biopelícula donde los tres tiempos de contacto mostraron diferencia significativa entre el tratamiento de cloro con relación al control ($P < 0.05$). La diferencia entre la interacción tiempo y tratamiento no presentó diferencia significativa ($P = 0.6749$). Para la prueba de suspensión, los tratamientos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($P > 0.05$), pero si una reducción de >5 Log con relación al control. En este proyecto la respuesta de las células hacia el contacto con el hipoclorito de sodio fue de mayor resistencia en biopelículas y más susceptibles en células en suspensión.

Palabras clave: Células planctónicas, células sésiles, micro titulación, prueba de suspensión

Abstract. Disinfection is a key tool to guarantee food safety. The aim of the study was to evaluate the efficacy of chlorine solution and the contact time to reduce the biofilm formation of three different microorganisms and compare the effectiveness of the disinfectant in attached bacteria (sessile cells) and suspended bacteria (planktonic cells). The study began with determining the ability to form biofilm of three different microorganisms that cause the deterioration of food: *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* under the treatment of a chlorine solution of 25 ppm at intervals of 5, 15 and 30 minutes. The experimental design used was Randomize Complete Block design with repeated measures over time. Counts were made for sessile cells in Log CFU/cm² and Log CFU/ml in biofilm formation. For analysis, the relationships between methods and time treatments for the biofilm quantification of the three contact times showed a significant difference to the chlorine treatment in relation to the control ($P < 0.05$). The difference between the interaction time and treatment did not show a significant difference ($P = 0.6749$). For the suspension test, the treatments did not show statistically significant differences ($P > 0.05$), but showed a reduction of >5 Log in relation to the control. In this project, the response of the cells in contact with sodium hypochlorite was more resistant in biofilms and more susceptible in the suspension test.

Key words: Micro titration, planktonic cells, sessile cells, suspension.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y METODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	10
5. RECOMENDACIONES.....	11
6. LITERATURA CITADA.....	12
7. ANEXOS	15

INDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Clasificación de caracteres de la producción de biopelícula según Stepanović <i>et al.</i> (2007)	4
2. Valores de densidad óptica (ODc) ± desviación estándar (dev.std) de la actividad de la biopelícula producida a partir de las cepas evaluadas según Stepanović <i>et al.</i> (2007).....	6
3. Efecto del tiempo de contacto de biopelícula con solución clorada (25 ppm) en los recuentos de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Log UFC/cm ²)	7
4. Efecto de tiempo de contacto de biopelícula con solución clorada (25 ppm) en los recuentos de <i>Escherichia coli</i> .(Log UFC/cm ²) según tres tiempos de contacto con cloro por el método de biopelícula.....	7
5. Efecto de tiempo de contacto de biopelícula con solución clorada (25 ppm) en los recuentos de <i>Staphylococcus aureus</i> (Log UFC/cm ²)	8
6. Recuentos de tres microorganismos (Log UFC/ml) según tres tiempos de contacto con solución clorada (25 ppm) por el método de prueba de suspensión	9
Anexos	Página
1. La titulación yodométrica del cloro.....	15
2. Cuadros sintaxis de los resultados emitidos por SAS para todos los ensayos.....	17

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza y en los sistemas alimentarios, los microorganismos se sienten atraídos por las superficies sólidas acondicionadas con nutrientes, que son suficientes para su viabilidad y crecimiento. Inicialmente, se depositan en las superficies y luego se unen, crecen y se multiplican activamente para formar una colonia de células. En este sentido, la formación de polímeros orgánicos es esencial, debido a que ayuda a la correcta colonización de microorganismos (Allison y Sutherland 1987). Esta masa de células se vuelve lo suficientemente grande como para atrapar desechos orgánicos e inorgánicos, nutrientes y otros microorganismos que conducen a la formación de una biopelícula microbiana. Las biopelículas se definen como una comunidad de microbios incrustados en una matriz de polímero orgánico, que se adhiere a una superficie (Carpenter y Cerf 1993).

Las biopelículas formadas en entornos de procesamiento de alimentos son de especial importancia, ya que tienen el potencial de actuar como una fuente persistente de contaminación microbiana que puede conducir al deterioro de los alimentos o la transmisión de enfermedades (Van Houdt y Michiels 2010). Las biopelículas se desarrollan muy a menudo en lugares difíciles de limpiar como grietas, esquinas, sellos, juntas y grietas que se pueden crear en materiales típicos de tuberías y puntos ciegos en los sistemas de conducción (Poulsen 1999).

La expresión de genes en biopelículas está evidentemente modulada por los factores físico-químicos dinámicos externos a la célula y puede implicar vías reguladoras complejas. Debido a estas diferentes expresiones génicas, las bacterias cultivadas en una biopelícula pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a antibióticos, biocidas y productos químicos inmunes en comparación con las mismas bacterias cultivadas en cultivos líquidos (Gristina *et al.* 1987). El desarrollo de las biopelículas se inicia cuando las bacterias pasan de una existencia planctónica a un estilo de vida donde los microorganismos se adhieren firmemente a las superficies bióticas o abióticas. Esta transición está regulada en parte por el estado nutricional del ambiente (Wimpenny y Colasanti 1997). Después de la unión inicial al sustrato, las células se someten a cambios fisiológicos, lo que resulta en una comunidad microbiana sésil altamente estructurada (Costerton *et al.* 1995). La adhesión es un proceso dependiente del tiempo y se puede dividir en dos fases: reversible e irreversible. La fase reversible (los microorganismos están cerca pero no en contacto real con la superficie) incluye principalmente varias interacciones a larga distancia (interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y fuerzas de Van de Waals). Las interacciones en la fase irreversible (la fase donde se unen a la superficie) son varias fuerzas de corto alcance que incluyen la interacción dipolo-dipolo, hidrófoba, ion-dipolo, ión-ion, enlaces covalentes e hidrógeno (Poulsen 1999).

El proceso de adhesión bacteriana está controlado por una serie de variables. Los factores ambientales que incluyen el pH, la temperatura, la composición de nutrientes y las características de la población de las bacterias juegan un papel importante en el cambio fenotípico de las células planctónicas a la forma sésil (Shi y Zhu 2009). Propiedades tales como la rugosidad superficial, capacidad de limpieza, desinfección, humectabilidad (determinada por hidrofobicidad) y vulnerabilidad al desgaste influyen en la capacidad de las células para adherirse a una superficie particular y así determinar el estado higiénico del material (Van Houdt y Michiels 2010).

Staphylococcus aureus es un anaerobio facultativo que puede crecer a una temperatura de 7 a 48 °C a un pH de 4 a 10 y a una humedad relativa de >85%. La intoxicación por estafilococos transmitida por los alimentos es una de las causas más frecuentes de gastroenteritis en todo el mundo (Stewart 2003). El género *Pseudomonas spp.* son bacterias ubicuas Gram-negativas, móviles y oxidasa positiva que florecen y habitan en una diversidad de ambientes. Los miembros del genero *Pseudomonas* tienen escasos requisitos nutricionales y son capaces de crecer bien en condiciones normales en poblaciones diversas con otros tipos de microorganismos (Palleroni 2005). *E. coli* se usa como un indicador de la calidad sanitaria del agua y del entorno de procesamiento de alimentos, y al adquirir factores de virulencia específicos, varias cepas de *E. coli* altamente adaptadas se han convertido en patógenos notorios que causan un amplio espectro de enfermedades y presentan un importante riesgo para la salud humana en todo el mundo (Van Houdt y Michiels 2005).

Un programa efectivo de saneamiento es el principal método de control de la ruta de contaminación superficial. Si el programa no es efectivo, los microorganismos y los residuos del producto permanecerán en concentraciones que pueden afectar la calidad y seguridad del producto alimenticio (Gibson 1999). En general, las bacterias adheridas parecen menos sensibles a los productos de limpieza y desinfección que las bacterias en suspensión. Uno de los principales problemas al evaluar la eficacia de la limpieza y desinfección es la cuantificación de microorganismos en las superficies que se están tratando (Gram 2007). En el 2014 se realizó un estudio por Frigo, en el cual se evaluaron las biopelículas microbianas en ambientes alimentarios: enfoques de estudio y estrategias de intervención, así como varios estudios que involucran evaluación de biopelículas y cómo erradicar esto de la industria alimentaria previniendo el riesgo de enfermedades. En otro estudio, Bellantuono (2014) evaluó la eficacia de diferentes desinfectantes (cloro, yodo, ácido peracético y compuestos de amonio cuaternario) y su acción para reducir biopelículas en la superficie de la industria alimentaria en donde la solución de cloro resultó la más efectiva.

Objetivos del estudio:

- Evaluar la eficacia de la solución de cloro y el tiempo de contacto para reducir la formación de biopelícula de tres microorganismos diferentes.
- Comparar la eficacia del desinfectante en bacterias adheridas (células sésiles) y bacterias suspendidas (células planctónicas)

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El proyecto fue realizado en la Università degli Studi di Udine ubicado en la región de Friuli Venezia Giulia, Italia. En el estudio, se evaluó la capacidad de formar biopelícula de tres microorganismos diferentes que causan el deterioro de los alimentos: una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Estas cepas fueron parte de la colección del Departamento de Agricultura, Alimentos, Animales y Ciencias del Medio Ambiente de la Universidad de Udine.

Preparación del inóculo.

Cada microorganismo fue sembrado y aislado en agar cuenta estándar e incubado por 24 hrs. *Pseudomonas fluorescens* se incubó a 30 °C y *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a 37 °C. La preparación del inóculo de la cepa microbiana implicó un aislamiento de rayado en placa de cada microorganismo con caldo BHI (Brain Heart Infusion). Consecuentemente para preparar 15-18 hrs de suspensión durante la noche. *Pseudomonas fluorescens* se incubó a 30 °C y *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a 37 °C.

Preparación de las placas con biopelícula.

Se llevó a cabo usando placas de micro titulación de 96 pocillos de poli estireno tratado con un fondo plano. Para cada placa de micro titulación, se prepararon 200 ml de caldo Luria Bertani (LB, triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l). Para los pocillos de muestra, se usaron 10 µL del inóculo con 200 µL del caldo LB. Para los pozos de control negativo (blanco), se dispensaron 200 µL de caldo LB y no se utilizó inóculo. Después de inocular las micro placas, se incubaron a 30 °C para *Pseudomonas spp.* y a 37 °C para *E. coli* y *S. aureus*. Después de 24 horas, se realizó un reemplazo del caldo LB de los pocillos tomando 200 µL del caldo Luria Bertani de los pocillos con microorganismos y colocando 200 µL caldo LB fresco e incubando de 24-72 hrs.

Determinación de la actividad de formación de biopelícula.

Cuando se completó el período de incubación (48-72 horas), los pocillos se vaciaron y se lavaron dos veces con solución salina buffer de fosfato (PBS) para eliminar las células que no se adhirieron para formar una biopelícula. Después de esto, las placas de micro titulación se secaron a 60 °C durante 60 minutos y luego cada pocillo se rellenó con 150 µL con una solución de colorante cristal violeta al 2% que se dejó actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de finalizar el tiempo, el colorante de cristal violeta en las placas de micro titulación se lavó con agua desionizada y las placas de micro titulación se dejaron secar a temperatura ambiente durante otros 30 minutos. Una vez concluido el

tiempo, se dispensaron 150 μL de etanol absoluto congelado en cada pocillo y las placas de microtitulación se colocaron luego en un lector de placa de micro titulación (Sunrise, Italia) para leer la absorbancia para densidad óptica a 570 nm. La interpretación de resultados se llevó a cabo de acuerdo con (Stepanović *et al.* 2007) clasificación de caracteres de la producción de biopelícula (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de actividad de la producción de biopelícula

Densidad Óptica [§]	Actividad de la Biopelícula
$\text{OD} \leq \text{ODc}^*$	Ausente (No formadora)
$\text{ODc} < \text{OD} \leq 2 \times \text{ODc}$	Débil
$2 \times \text{ODc} < \text{OD} \leq 4 \times \text{ODc}$	Promedio
$4 \times \text{ODc} < \text{OD}$	Fuerte

[§] Todas las densidades ópticas se expresan como el promedio de tres observaciones OD densidad óptica del tratamiento. El valor de OD final de una cepa se expresa como el valor de OD medio de la cepa por el valor de ODc ($\text{OD} = \text{promedio de una cepa} - \text{ODc}$). ODc densidad óptica de corte = OD promedio de control negativo + 3 desviaciones estándar del control negativo). El valor de ODc se calcula para cada placa de microtitulación por separado. Si se obtiene un valor negativo, debe presentarse como cero, mientras que cualquier valor positivo indica la producción de biopelícula.

Fuente: Stepanović *et al.* 2007

Cuantificación de formación de biopelícula para conteo de células sesiles.

Se prepararon placas con biopelícula para cada microorganismo como se describió anteriormente. Cuando se completó el período de incubación (24 horas), los pocillos se vaciaron y lavaron dos veces con 200 μL de Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) para eliminar las células no adherentes. Para el procedimiento de placa de micro titulación, se dispuso una concentración de 200 μL de PBS para los pocillos de control. Para los pocillos tratados, se dispensaron 200 μL de solución de cloro de 25ppm (la concentración de cloro se verificó mediante titulación yodométrica). El tiempo de contacto para cada uno fue de 5, 15 y 30 minutos. Una vez que finalizó el tiempo requerido, los pocillos se vaciaron y se utilizó tiosulfato de sodio como neutralizador (0.5%) 200 μL para cada pocillo. El tiempo de contacto del tiosulfato de sodio fue el mismo que para el tratamiento con solución de cloro (5, 15 y 30 minutos).

Posteriormente, en cada pocillo, se dispensaron 200 μL de tripsina (Sigma, Italia); se dejó actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después del tratamiento con tripsina, las células se recuperaron raspando el pocillo con la punta estéril de la micropipeta y aspirando 100 μL de la suspensión. La suspensión obtenida se sometió a recuento viable mediante diluciones en serie en 900 μL de diluyente de recuperación máximo (MRD) utilizando el método de recuento de gotas utilizando cinco gotas de 10 μL en diluciones decimales (10^0 hasta 10^5) en placas con agar cuenta estándar (ACE). Se incubaron a 30 °C durante 24-48 h para *Pseudomonas spp.* y a 37 °C durante 24 h para *S. aureus* y *E. coli*. Los recuentos se expresaron en UFC/cm² mediante la ecuación 1.

$$UFC/cm^2 = \frac{UFC \text{ en } 50 \mu L \times 4 \times \text{factor de dilución}}{0.32} \quad [1]$$

200 μ L= volumen de cada pocillo (correspondiente a 50 μ L (gota) \times 4= 200)
 contar las colonias de cada gota (10 correspondientes). Debes contar las colonias de las 5
 gotas (10 \times 5 equivalentes a 50 μ L)

Los datos finales son: número de colonias (UFC) en 50 μ L \times 4 \times factor de dilución = UFC/
 pocillo (200 μ L)

0.32 (cm^2) es la superficie del fondo de cada pocillo de placas de micro titulación.

Prueba de suspensión para conteo de células planctónicas.

Se preparó un inóculo de cada microorganismo en caldo BHI como se describió antes. El cultivo se sometió a dos lavados consecutivos y centrifugaciones a 130 rpm por dos minutos con solución salina estéril y se re suspendió en un volumen igual de la misma solución. Luego se puso en contacto 1 ml de esta solución para las tres soluciones de tiempo de contacto minutos a 20 °C con 9 ml de solución desinfectante preparada con agua de grifo estéril, a la que se añadió solución desinfectante de solución de cloro a una concentración de 25 ppm. Posteriormente, se puso en contacto 1 ml de la suspensión durante los tres tiempos de contacto a 20 °C con 9 ml de una solución neutralizante obtenida disolviendo tiosulfato sódico al 0.5% en agua corriente estéril. El método de la placa de caída se usó usando cinco gotas de 10 μ L en cinco diluciones en placas con agar sin gelatina sin azúcar (Oxoid, Italia). Las placas se incubaron a 30 y 37 °C durante 24 horas.

La tasa de supervivencia se determinó mediante la evaluación del número de células que permanecieron viables después del tratamiento en comparación con un inóculo de concentración no tratada. Los recuentos se expresaron en UFC/ml mediante la ecuación 2:

$$\frac{UFC}{ml} = UFC \times 50\mu L \times 20 \times \text{factor de dilución} \quad [2]$$

Diseño experimental y análisis estadístico.

Los datos fueron reportados en Log UFC/ cm^2 para la biopelícula y en Log UFC/ml para la prueba de suspensión. Se usó un diseño de Bloques Completos al Azar con medidas repetidas en el tiempo. Se realizaron tres repeticiones para un total de 27 unidades experimentales. La separación de medias se realizó mediante el método de medias mínimas cuadradas (LS MEANS) con un nivel de significancia $P < 0.05$ mediante el programa "Statistical Analysis System" SAS versión 9.4.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la actividad de formación de biopelícula.

Los valores obtenidos mediante el análisis de densidad óptica permiten clasificar a los microorganismos en formadores débiles, moderados o fuertes (Cuadro 2). Según los resultados obtenidos por Ghellai *et al.* en el 2014 con 50 aislados de *Staphylococcus aureus*, 16 (32%) fueron designados como no adherentes, 20 (40%) como débilmente 10 (20%) como moderadamente y 4 (8%) como fuertemente adherentes. En otro estudio realizado por Dias en el presente año, por el método de Stepanović *et al.* (2007) se implementaron tres tiempos de formación de biopelícula (24, 48 y 72 hrs) para *Pseudomonas fluorescens* donde mostró una producción de biopelícula débil y moderada para los diferentes tiempos de muestreo. Para *Escherichia coli*, en un estudio realizado por Skyberg *et al.* en el 2006, la producción de biopelículas fue medida por grupos de cepas, en el cual el compuesto principalmente por *E. coli* mostraron una actividad de biopelícula fuerte según lo determinado por una electroforesis enzimática.

Cuadro 2. Valores de densidad óptica (ODc) \pm desviación estándar (dev.std) de la actividad de la biopelícula producida a partir de las cepas evaluadas según Stepanović *et al.* (2007).

Microorganismo	ODc \pm dev. Std	Actividad de la Biopelícula
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.581 \pm 0.090	Fuerte
<i>Escherichia coli</i>	1.564 \pm 0.156	Moderado
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.564 \pm 0.156	Moderado

Cuantificación de formación de biopelícula para conteo de células sésiles.

No se encontró diferencia significativa entre los recuentos de los microorganismos del control respecto al tiempo ($P = 0.6749$). Para las muestras con cloro a 25 ppm, una concentración de células más alta se encontró a los 15 minutos con 7.66 Log UFC/cm², siendo esta diferente significativamente a la concentración de los 5 y 30 minutos (Cuadro 3). Según Mosteller y Bishop (1993), los productos desinfectantes que se usarán contra las biopelículas deben ser capaces de garantizar una inactivación de al menos tres unidades logarítmicas en la población microbiana. El objetivo de reducir la cantidad de bacterias adheridas a la superficie fue de tres ciclos logarítmicos o una reducción del 99.9%. Muchos agentes de control biológico de *Pseudomonas fluorescens* y especies estrechamente relacionadas están bien caracterizados por su capacidad para producir compuestos antimicrobianos, incluyendo 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), fenazinas, cianuro de hidrógeno y surfactantes (Haas y De'fago 2005).

Cuadro 3. Efecto del tiempo de contacto de biopelícula con solución clorada (25 ppm) en los recuentos de *Pseudomonas fluorescens* (Log UFC/cm²).

Tiempo (min)	Control (0 ppm)	Cloro (25 ppm)	Reducción en LOG ± DE
5	8.12 ± 0.70 ^{Aa}	6.91 ± 0.70 ^{Bb}	1.21 ± 1.10
15	8.19 ± 0.14 ^{Aa}	7.66 ± 0.03 ^{Aa}	0.53 ± 0.04
30	7.85 ± 0.14 ^{Aa}	6.86 ± 0.27 ^{Bb}	1.00 ± 0.05

Los valores representados en el cuadro corresponden a al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones independientes

^{ABC} Medias con letras mayúsculas diferentes en cada fila denotan diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

^{abc} Medias con letras minúsculas diferentes en cada columna denotan diferencias significativas entre tiempos de contacto (P<0.05).

Para las muestras de *E. coli*, no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de cada tratamiento a lo largo del tiempo. Diferencia significativa fue encontrada entre el control y las muestras con cloro a los 30 minutos, donde las muestras tratadas con cloro mostraron una reducción en UFC en 1.67 Log UFC (Cuadro 4). Las cepas de *E. coli* patógenas utilizan múltiples mecanismos de manera similar a las otras bacterias que infectan mucosas, con 29 etapas de adhesión y colonización de la mucosa, evasión de los mecanismos de defensa, multiplicación y daño tisular (Kaper *et al.* 2014). La disminución de la acción del hipoclorito de sodio contra las biopelículas se debe a la penetración limitada derivada de una interacción reacción-difusión. El cloro se consume antes de que pueda penetrar completamente en la superficie de las biopelículas (Beer *et al.* 1994).

Cuadro 4. Efecto del tiempo de contacto de biopelícula con solución clorada (25 ppm) en los recuentos de *Escherichia coli* (Log UFC/cm²).

Tiempo (min)	Control	Cloro (25 ppm)	Reducción en LOG ± DE
5	7.87 ± 0.40 ^{Aa}	6.64 ± 1.76 ^{Aa}	1.24 ± 3.74
15	8.07 ± 0.10 ^{Aa}	7.57 ± 0.14 ^{Aa}	0.49 ± 0.02
30	7.85 ± 0.27 ^{Aa}	6.18 ± 1.64 ^{Ab}	1.67 ± 4.13

Los valores representados en el cuadro corresponden a al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones independientes

^{ABC} Medias con letras mayúsculas diferentes en cada fila denotan diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

^{abc} Medias con letras minúsculas diferentes en cada columna denotan diferencias significativas entre tiempos de contacto (P<0.05).

En los tratamientos con el microorganismo *Staphylococcus aureus*, no se encontró diferencia significativa entre las muestras de cada tratamiento (Cuadro 5). Se encontró

diferencia significativa entre las muestras a los 30 minutos donde la muestra con cloro mostró una reducción en concentración comparada al control. Este efecto se debe al mecanismo de acción germicida del hipoclorito de sodio, el cual tiene un amplio espectro antimicrobiano. Esto se atribuye a la penetración de HOCl en la célula microbiana través de la pared celular y la membrana. Se cree que el mecanismo de la actividad germicida de HOCl o ion hipoclorito (-OCl) es debido a la inhibición de la actividad enzimática esencial para el crecimiento, daño a la membrana y ADN, y tal vez una lesión a la capacidad de transporte de membrana (Fukuzaki 2006). Las cepas de *Staphylococcus aureus* crecen bajo diferentes condiciones de estrés (temperatura, cloruro de sodio, glucosa y etanol) relevantes para el procesamiento de alimentos. Se identifican como fuertes formadores de biopelículas entre las cepas de *Staphylococcus aureus* relacionadas con los alimentos y la formación de biopelículas se vio afectada por las condiciones ambientales relevantes para la industria alimentaria (Rode *et al.* 2007).

Cuadro 5. Efecto del tiempo de contacto de biopelícula con solución clorada (25 ppm) en los recuentos de *Staphylococcus aureus* (Log UFC/cm²).

Tiempo (min)	Control	Cloro (25 ppm)	Reducción en LOG ± DE
5	8.22 ± 0.11 ^{Aa}	7.29 ± 0.77 ^{Aa}	0.93 ± 1.54
15	8.15 ± 0.11 ^{Aa}	7.45 ± 0.37 ^{Aa}	0.70 ± 0.18
30	7.81 ± 0.19 ^{Aa}	6.57 ± 1.01 ^{Ab}	1.24 ± 1.37

Los valores representados en el cuadro corresponden a al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones independientes

^{ABC} Medias con letras mayúsculas diferentes en cada fila denotan diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

^{abc} Medias con letras minúsculas diferentes en cada columna denotan diferencias significativas entre tiempos de contacto (P<0.05).

Prueba de suspensión para conteo de células planctónicas.

En relación al efecto de la solución de cloro en tres tiempos de contactos, los tratamientos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos (P >0.01), pero si una reducción de >5 log con relación al control (Cuadro 6).

Se realizaron pruebas de suspensión para determinar la eficacia de la solución de cloro en frente a células no adherentes (planctónicas). Para aprobar la prueba AOAC Germicidal and Detergent Sanitizer, un desinfectante debe reducir la población microbiana en ciclos de 5 log (99.999%) después de una exposición de 30 s para que se considere efectivo (Mosteller y Bishop 1993). Los resultados de las pruebas de suspensión (Cuadro 6) mostraron que la solución de cloro a 25 ppm utilizado en este estudio fue efectivo para reducir el número de bacterias al menos 5 ciclos log.

Las bacterias sésiles resisten mejor a varios factores de estrés fisicoquímicos, como los agentes antibacterianos. Una adaptación de la fisiología celular de las células adheridas en los primeros pasos de la adhesión puede haber inducido una mayor resistencia. Tal

adaptación podría explicar la mayor resistencia. Las bacterias adheridas actúan como un "escudo" y reducen el acceso de las células sésiles presentes en el fondo de la biopelícula. Esta matriz puede actuar como una barrera polianiónica que funciona como una resina de intercambio iónico capaz de unir un gran número de moléculas.

El desarrollo de biopelículas debe evitarse para evitar la contaminación peligrosa por las células patógenas restantes (Chavant 2004). Esta mayor resistencia a morir se debe a la lentitud de crecimiento a altos niveles persistentes producidos en la fase estacionaria de poblaciones planctónicas. De hecho, los biopelículas muestran más tolerancia a los antimicrobianos que la fase logarítmica planctónica de células. Está bien establecido que las células que crecen rápidamente son más susceptibles al crecimiento de inhibición y muerte. Las biopelículas son más resistentes que las células planctónicas de fase estacionaria. Esto ha llevado a sugerencias de que los mecanismos de resistencia específicos pueden expresarse en biopelículas (Spoering y Lewis 2001).

Cuadro 6. Recuentos de tres microorganismos (Log UFC/ml) según tres tiempos de contacto con cloro por el método de prueba de suspensión.

Microorganismo	Tiempo (min)	Reducción[§] en Log ±Dev. std
<i>P. fluorescens</i>	5	7.47 ± 0.06
	15	6.08 ± 2.51
	30	5.95 ± 2.66
<i>E. coli</i>	5	5.18 ± 2.52
	15	7.29 ± 0.05
	30	5.91 ± 2.60
<i>S. aureus</i>	5	6.03 ± 2.38
	15	6.17 ± 2.26
	30	7.53 ± 0.05

[§] No hay diferencia significativa entre los tratamientos (P> 0.05).

4. CONCLUSIONES

- Se demostró la eficacia de la solución del hipoclorito de sodio (25 ppm) en los tres tiempos de contacto para reducir la formación de bacterias en la formación de biopelículas y la prueba de suspensión.
- El hipoclorito de sodio tuvo los mejores resultados en bacterias suspendidas (células planctónicas) que en bacterias adheridas (células sésiles).

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar la eficacia de la solución de cloro en diferentes superficies de la industria alimentaria.
- Realizar estudios acerca de la eliminación de biopelículas bajo tratamientos enzimáticos.

6. LITERATURA CITADA

Allison DG, Sutherland IW. 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J Gen. Microbiol.* 133:1319-1327.

Bellantuono E. 2014. Evaluación de la eficacia de las sustancias antimicrobianas contra la biopelícula de *Pseudomonas fluorescens* [Tesis]. Universita Degli Studi Di Udine. 35p.

Beer D, Srinivasan R, Stewart P. 1994. Direct Measurement of Chlorine Penetration into Biofilms during Disinfection. *Applied and Environmental Microbiology.* 60(12):4339-4344.

Carpentier B, Cerf O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Applied Bacteriology.* 75 (6):499-511.

Chavant P, Gaillard B, Hébraud M. 2004. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiology Letters.* 236: 241–248.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49(1):711–745.

Dias C, Borges A, Oliveira D, Martinez-Murcia A, Saavedra MJ, Simões M. 2018. Biofilms and antibiotic susceptibility of multidrug-resistant bacteria from wild animals. *PeerJ* 6:e4974.

Frigo F. 2014. Microbial biofilms in food environments: study approaches and intervention strategies [Tesis]. Università Degli Studi Di Udine. 140 p.

Fukuzaki S. 2006. Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes. *Biocontrol Science.* 11(4): 147-157

Ghellai L, Hassaine H, Klouche N, Khadir A, Aissaoui N, Nas F, Zingg W. 2014. Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen. *Journal of Bacteriology Research.* 6(1):1-6.

Gram L. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Biofilms in the food and beverage industry.* *Food Control.* 18(10):1165-1171.

- Gibson H. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol* 87(1): 1-48.
- Gristina AG, Hobgood CD, Webb LX. 1987. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials*. 8(6):423-426.
- Haas, D, De 'fago, G. 2005. Biological control of soilborne pathogens by fluorescent pseudomonas. *Nat Rev Microbiol* 3: 307–319.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2014. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2: 123-140.
- Mosteller TM, Bishop JR. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. Department of Food Science and Technology, Virginia Polytechnic Institute and State University. *J of Food Protection* 56 (1): 34-41.
- Palleroni NJ. 2005. Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York, pp. 323-379.
- Poulsen LV. 1999. Microbial biofilm in food processing. *LWT-Food Science and Technology*. 32(6): 321-326.
- Rode TM, Longsrud S, Holck A, Moretro T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol*. 116(3): 372-383.
- Shi, X., & Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*. 20(9):407-413.
- Skyberg JA, Siek KE, Doetkott C, Nolan LK. 2006. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J of Appl Microbiol*. 102 (2007): 548-554.
- Spoering A, Lewis K. 2001. Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *Journal of Bacteriology*. 183(23): 6746–6751.
- Stewart C. 2003. Managing the risk of staphylococcal food poisoning from cream-filled baked goods to meet a food safety objective. *J Food Protection*. 66(7):1310–1325.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 115(8):891-899.

Van Houdt R, Michiels CW. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol*, 109(4): 1117-1131.

Van Houdt R, Michiels CW. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*. 156(5): 626-633.

Wimpenny JWT, Colasanti R. 1997. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol Ecol*. 22:1-16

7. ANEXOS

Anexo 1. Método de titulación yodométrica de cloro

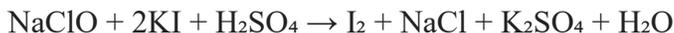
Este método se realiza para encontrar el efecto real del cloro en la solución de tiosulfato de sodio.

1. Coloque una bureta y cárguela con una solución de tiosulfato de sodio.
 2. Tomar 10 ml de solución stock de cloro (Sigma, Italia) transferirlos a un matraz de 100 ml que contiene aprox. 20 ml de agua des ionizada y luego llevar al volumen. Repita la operación con la solución diluida de cloro → dilución final 1: 100.
 3. Pesar 1 g de yoduro de potasio y transferirlo a un matraz cónico que contiene 5 ml de agua des ionizada.
 4. Después de que el yoduro de potasio se haya derretido completamente, agregue 5 ml de H₂SO₄ 10% en el matraz.
 5. Transfiera 50 ml de la solución diluida de cloro 1: 100 al matraz, manteniendo agitado el contenido del matraz.
 6. Tape y agite por 1 minuto. La solución contenida en el matraz toma un color marrón.
 7. Valorar con la solución de tiosulfato de sodio hasta que el color de la solución titulada se vuelva amarillo.
 8. Agregue 1 ml de solución de almidón. La solución contenida en el matraz es de color azul-violeta.
 9. Complete la valoración (decoloración completa de la solución valorada).
- * Se usaron 5,05 ml de solución de tiosulfato de sodio en tres ensayos realizados.

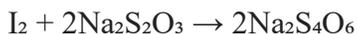
Cálculos, observaciones y notas:

La concentración de la muestra de solución de cloro se expresa con los gramos de cloro (Cl₂) que se desarrollan a partir de 100 ml de la muestra en sí. La cantidad de I₂ liberada, equivalente al oxidante, se valora con una solución titulada y se vuelve amarilla, útil para poder capturar mejor el punto de cambio de color.

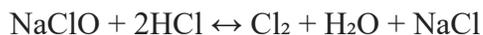
La primera reacción que ocurre al agregar al yoduro de potasio NaClO y ácido sulfúrico es la siguiente:



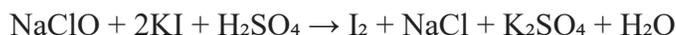
Luego, agregando el titulante a los productos de la reacción previa, el yodo elemental sufre una reducción y yoduro:



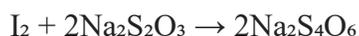
Finalmente, para calcular los gramos de Cl₂ debemos referirnos a este último equilibrio:



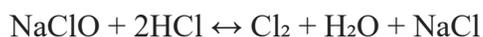
Para calcularlos, partimos del ml de solución de titulante Na₂S₂O₃ utilizada:



Luego, agregando el titulante a los productos de la reacción previa, el yodo elemental sufre una reducción y yoduro:



Finalmente, para calcular los gramos de Cl₂ debemos referirnos a este último equilibrio:



Para calcularlos, partimos del ml de solución de titulante Na₂S₂O₃ utilizada:

N test ml titulante

1 5.3

La segunda reacción muestra que la relación de estequiometría entre titulante y yodo elemental es calcular los moles de I₂ que reaccionan con el Na₂S₂O₃, que será la mitad:

N test litri Na₂S₂O₃ molaridad Na₂S₂O₃ moles Na₂S₂O₃ moles I₂

1 0.0053 0.1 0.00053 0.000265

Desde la primera reacción, es evidente que la relación de estequiometría entre NaClO (el agente oxidante contenido en la muestra de solución de cloro) y el yodo elemental desarrollado es:

1 mol de NaClO: 1 mol I₂

Como puro de la última reacción, la relación de estequiometría es:

1 mol de NaClO: 1 mol de Cl₂,

Es decir, se repite una proporción de 1: 1

A la luz de esto, es posible calcular los moles y, en consecuencia, los gramos de Cl₂ que se pueden desarrollar a partir del volumen de la muestra titulada

N test moles I₂ moles Cl₂ p.m. Cl₂ gramos Cl₂

1 0.000265 0.000265 70.9 u.m.a. 0.018789

Estos son los gramos de Cl₂ que se pueden desarrollar a partir de 50 ml de solución de muestra de solución de cloro:

$0.018789 \times 2 \times 100 = 3.7577$ (%)

Anexo 2. Cuadros sintaxis de los resultados emitidos por SAS para todos los ensayos

Prueba de Biopelícula

Microorganism=*Escherichia coli*.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	13.73760243	1.96251463	2.71	0.0746
Error	10	7.24615706	0.72461571		
Corrected Total	17	20.98375949			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	UFC Mean
0.654678	11.55810	0.851244	7.364907

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tiempo	2	2.02990215	1.01495108	1.40	0.2909
Trt	1	5.77547000	5.77547000	7.97	0.0181
Rep	2	4.86369505	2.43184753	3.36	0.0767
Tiempo*Trt	2	1.06853521	0.53426761	0.74	0.5027

Microorganism=*Pseudomonas fluorescens*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	5.48464578	0.78352083	6.61	0.0042
Error	10	1.18569173	0.11856917		
Corrected Total	17	6.67033751			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	UFC Mean
0.822244	4.532793	0.344339	7.596613

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tiempo	2	1.03487809	0.51743905	4.36	0.0434
Trt	1	3.72807500	3.72807500	31.44	0.0002
Rep	2	0.35594935	0.17797467	1.50	0.2691
Tiempo*Trt	2	0.36574334	0.18287167	1.54	0.2607

Microorganism=*Staphylococcus aureus*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	6.64046947	0.94863850	3.53	0.0354
Error	10	2.68854511	0.26885451		
Corrected Total	17	9.32901458			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	UFC Mean
0.711808	6.837064	0.518512	7.583837

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tiempo	2	1.37571273	0.68785637	2.56	0.1267
Trt	1	4.12952285	4.12952285	15.36	0.0029
Rep	2	0.91526507	0.45763254	1.70	0.2311
Tiempo*Trt	2	0.21996882	0.10998441	0.41	0.6749

Prueba de Suspensión

Microorganism=*Escherichia coli*.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	3.81022623	1.90511312	0.44	0.6651
Error	6	26.16520735	4.36086789		
Corrected Total	8	29.97543359			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Red Mean
0.127112	32.79708	2.088269	6.367241

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tiempo	2	3.81022623	1.90511312	0.44	0.6651

Microorganism=*Pseudomonas fluorescens*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	4.25615880	2.12807940	0.48	0.6422
Error	6	26.75656833	4.45942805		
Corrected Total	8	31.01272713			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Red Mean
0.137239	32.47889	2.111736	6.501872

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tiempo	2	4.25615880	2.12807940	0.48	0.6422

Microorganism=*Staphylococcus aureus*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	4.16661242	2.08330621	0.58	0.5884
Error	6	21.54740286	3.59123381		
Corrected Total	8	25.71401528			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Red Mean
0.162037	28.82036	1.895055	6.575403

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tiempo	2	4.16661242	2.08330621	0.58	0.5884