

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA

**Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas de bacterias mesófilas y termófilas
aisladas de leche cruda, pasteurizada y procesada mediante tratamiento de ultra alta
temperatura (UHT)**

Disertación previa a la obtención del título de licenciada en Microbiología

Autora: Romina Alexandra Camacho Puyol

Director: Martín Sebastián Marcial Coba

Línea de investigación: Microbiología de alimentos

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología de la Srta. Romina Alexandra Camacho Puyol ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Dr. Martín Marcial Coba
Director de la Disertación
Quito, 16 de junio del 2023

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mi familia, principalmente, a mis padres que me han apoyado en todo momento, en cada paso y decisión de mi vida. Por ser mis pilares y estar en los buenos, pero sobre todo en los malos momentos y no dejarme morir en el intento de cumplir este sueño, a ustedes que se han esforzado tanto para que pueda estudiar y no me rinda en el camino.

A mis hermanos, por ser un increíble apoyo, consejo y ayuda siempre que la he necesitado, por ser mis cómplices y amigos. Gracias a todos por su cariño incondicional.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la PUCE, por apoyarnos con el uso de sus instalaciones y el apoyo financiero para conseguir los materiales necesarios para realizar este trabajo. A Martín Marcial Coba, mi director, por su apoyo incondicional en todo este camino, por la generosidad con su conocimiento, la paciencia y sobre todo por haber creído en mis capacidades y animarme constantemente a seguir mejorando, por la preocupación y no abandonarnos en este proceso a pesar de las caídas, las equivocaciones y los regaños. Gracias por todos los consejos, el café en las reuniones y las revisiones meticulosas, todos y cada uno de estos detalles han sido un aporte fundamental para mi crecimiento profesional y personal.

A Gaby Felicita, por su ayuda y enseñanzas en el laboratorio, gracias por la confianza y estar siempre dispuesta a colaborarnos en todo lo que pudiera. Al personal de la sala de preparaciones por prestarnos los materiales que nos hicieran falta para el desarrollo de este trabajo.

A Dios y mi familia, que son el motor de mis sueños, los guías de mi vida y la mejor compañía a lo largo de este camino, agradecida y orgullosa de tener a personas tan maravillosas en mi día a día. A mi hermano Bachan por ayudarnos a conseguir las placas de acero inoxidable, que fueron de suma importancia para realizar uno de los ensayos de este trabajo.

Y finalmente, gracias a Dany y Eri, por ser unas increíbles compañeras y amigas, por hacer los días más llevaderos y menos pesados, por todas las risas y los apuros que pasamos en el laboratorio, gracias por estar.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 4. OBJETIVOS..... | 7 |
| 4.1 GENERAL | 7 |
| 4.2 ESPECÍFICOS | 7 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 8 |
| 5.1 CEPAS BACTERIANAS..... | 8 |
| 5.2 TAMIZAJE DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS DE POLIESTIRENO..... | 8 |
| 5.3 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN PRESENCIA DE CLORURO DE MAGNESIO COMO AGENTE INHIBIDOR..... | 9 |
| 5.4 ENSAYO DE ADHERENCIA A SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE SUMERGIDAS EN LECHE | 9 |
| 5.5 PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE ESPORAS | 10 |
| 5.6 RESISTENCIA DE LAS ESPORAS AL CALOR | 10 |
| 5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS | 11 |
| 6. RESULTADOS | 12 |
| 6.1 TAMIZAJE DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS DE POLIESTIRENO Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN PRESENCIA DE CLORURO DE MAGNESIO COMO AGENTE INHIBIDOS | 12 |
| 6.2 ENSAYO DE ADHERENCIA DE BIOPELÍCULAS A SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE SUMERGIDAS EN LECHE..... | 14 |
| 6.3 RESISTENCIA DE LAS ESPORAS AL CALOR | 14 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 7. DISCUSIÓN..... | 16 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 21 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 22 |
| 10. FIGURAS | 27 |
| 11. TABLAS..... | 30 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 2 Capacidad formadora de biopelículas en ausencia y presencia de MgCl ₂ 5 mM de bacterias termófilas | 13 |
| Tabla 4 Recuento de células planctónicas en leche y de células de biopelículas en placas de acero inoxidable de bacterias termófilas | 14 |
| Tabla 5 Recuento de esporas bacterianas luego de tratamiento térmico a 80 o 90 °C..... | 15 |
| Tabla 1 Capacidad formadora de biopelículas en ausencia y presencia de MgCl ₂ 5 mM de bacterias mesófilas | 30 |
| Tabla 3 Recuento de células planctónicas en leche y de células de biopelículas en placas de acero inoxidable de bacterias mesófilas | 32 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** *Extracción de cristal violeta con solución de alcohol-acetona en microplacas de poliestireno de 96 pocillos para el tamizaje de la capacidad formadora de biopelículas* 27
- Figura 2** *Placa de acero inoxidable luego del enjuague con agua Mili-Q esteril, con adherencia de biopelícula*..... 27
- Figura 3** *Crecimiento de colonias recuperadas de biopelículas, sembradas por la técnica de microgota en caja Petri con medio TSA*..... 28
- Figura 4** *Crecimiento de colonias recuperadas de leche, sembradas por la técnica de microgota en caja Petri con medio TSA, en el contador de colonias*..... 28
- Figura 5** *Cepas formadoras de esporas inoculadas en leche descremada estéril, en incubadora con agitación*29

1. RESUMEN

La leche constituye el medio ideal para el desarrollo de bacterias potencialmente deterioradoras de las propiedades organolépticas del producto comercial. En ese contexto, estas bacterias poseen la capacidad de potencialmente formar biopelículas, condición que les permite sobrevivir a distintas etapas a lo largo procesamiento industrial de la leche. En Ecuador no existen estudios sobre la capacidad formadora de biopelículas de bacterias de crecimiento mesofílico y termofílico provenientes de la leche. Por tal razón, el presente estudio tuvo evaluó dicha capacidad en superficies de poliestireno y acero inoxidable, mediante espectrofotometría y recuento en placa, respectivamente. Adicionalmente, evaluó el efecto del cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 5mM como agente inhibidor y también la respuesta de microorganismos esporulados, en forma planctónica y de biopelícula, al calor. Doce de las quince cepas mesofílicas, fueron capaces de formar biopelículas en placas poliestrieno. Asimismo, se observó que dos de los cuatro aislamientos termofílicos también lo hicieron. Como respuesta a la presencia de $MgCl_2$ 5mM, la DO_{492nm} de todas las cepas se redujo considerablemente, aunque cuatro de ellas no fueron inhibidas. Adicionalmente, todas las cepas que inicialmente formaron biopelículas en placas de poliestireon, también lo hicieron sobre acero inoxidable. Sin embargo, se pudo evidenciar que no necesariamente una cepa con elevada capacidad formadora de biopelículas en poliestireno, exhiba la misma por acero inoxidable. Finalmente, no se observó variación en el recuento de esporas en los diferentes tratamientos térmicos (80 y 90 °C).

Palabras clave: bacterias, biopelículas, cloruro de magnesio, esporas, microgota

2. ABSTRACT

The milk constitutes the ideal medium for the development of potentially deteriorating bacteria of the organoleptic properties of the commercial product. In this context, these bacteria have the ability to potentially form biofilms, a condition that allows them to survive through different stages along the industrial processing of the milk. In Ecuador, there are no studies on the biofilm-forming capacity of mesophilic and thermophilic bacteria from milk. For this reason, the present study evaluated this capacity on polystyrene and stainless steel surfaces, using spectrophotometry and plate counting, respectively. Additionally, it evaluated the effect of magnesium chloride (MgCl_2) 5mM as an inhibitory agent, as well as the response of spore-forming microorganisms, both in planktonic and biofilm form, to heat. Twelve of the fifteen mesophilic strains were able to form biofilms on polystyrene plates. Additionally, it was observed that two of the four thermophilic isolates also did so. In response to the presence of MgCl_2 5mM, the $\text{OD}_{492\text{nm}}$ of all strains was significantly reduced, although four of them were not inhibited. Additionally, all strains that initially formed biofilms on polystyrene plates also did so on stainless steel. However, it was evidenced that a strain with high biofilm-forming capacity on polystyrene does not necessarily exhibit the same capacity on stainless steel. Finally, no variation was observed in spore counts under different heat treatments (80 and 90 °C).

Key words: bacteria, biofilms, magnesium chloride, spores, microdroplets.

3. INTRODUCCIÓN

Por su contenido nutricional y aporte energético, la leche es uno de los alimentos más ampliamente consumidos a nivel global por el ser humano, desde la infancia hasta la tercera edad (Fernández et al., 2015). Estas mismas propiedades, hacen que la leche sea un medio óptimo para el desarrollo de microorganismos, entre los que se incluyen patógenos y deterioradores. Consecuentemente, la leche bovina cruda requiere de procesos térmicos industriales capaces de eliminar esta microbiota y obtener un producto comercial apto para el consumo humano (Fernández et al., 2015). Uno de ellos es el tratamiento de ultra alta temperatura (UHT) que consiste en someter el alimento líquido a elevadas temperaturas dentro de un rango de 132 a 155 °C por un tiempo de 1 a 5 segundos, con el propósito de reducir drásticamente la carga microbiana, minimizando simultáneamente las pérdidas nutricionales y cambios organolépticos (Simpson et al., 2000). Este procedimiento conduce a la obtención de un producto comercialmente estéril con una vida útil de aproximadamente seis meses (Lorenzen et al., 2011). Sin embargo, algunas investigaciones han reportado que varias especies bacterianas han sido aisladas a partir de muestras de leche UHT, sugiriendo la contaminación con estos microorganismos y su supervivencia durante el procesamiento, envasado y almacenamiento del producto terminado (Kmiha et al., 2017; Scheldeman et al., 2006). En conexión con esto, el recuento de mesófilos aerobios, es uno de los parámetros de calidad e higiene más importantes de la leche cruda, pasteurizada y UHT. Un recuento alto de estos microorganismos, podría indicar que la leche se produjo, almacenó y procesó en malas condiciones e inclusive que existe la presencia de patógenos (Abd et al., 2014).

Las bacterias formadoras de esporas exhiben mayor tolerancia a las elevadas temperaturas aplicadas durante el procesamiento de la leche y ocasionalmente pueden sobrevivir al mismo, causando el deterioro en la calidad de los productos manufacturados (Abd et al., 2014; Reginensi et al., 2014; Sadiq et al., 2017). Por lo tanto, merecen especial atención entre los miembros de la microbiota total de la leche (Abd et al., 2014). Entre las bacterias esporuladas, las especies de crecimiento mesofílico y termofílico se asocian, de manera significativa, a la contaminación microbiana en diversas industrias procesadoras de alimentos en donde se ocupan temperaturas superiores a 45 °C (Abd et al., 2014; Cempírková, 2007). En conexión con esto, cuando este tipo de organismos se exponen a condiciones de estrés como carencia de nutrientes, agentes biocidas, radiación UV y temperaturas elevadas, entre otras, se induce el proceso de esporulación (Tan y

Ramamurthi, 2014). Esto conduce a un estado de dormancia metabólica y de deshidratación parcial del contenido de la endospora (Mckenney et al., 2013). Tal condición, junto con la estructura de una robusta cubierta, formada por múltiples capas de proteínas, constituyen factores relacionados a la tolerancia incrementada a factores hostiles como los ya mencionados, incluyendo las temperaturas características del procesamiento industrial de leche UHT (Aguas-Mendoza et al., 2016; Henriques y Moran, 2000). *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. sporothermodurans*, *B. thermoamylovorans*, *B. licheniformis*, *Geobacillus*, *stearothermophilus*, *G. thermoleovorans*, *Paenibacillus odorifer*, *P. polymyxa*, *P. amylolyticus* y *Lysinibacillus fusiformis*, entre otras, son especies representativas de bacterias esporuladas mesofílicas y termofílicas aisladas con mayor frecuencia de la cadena de procesamiento de leche y del producto terminado (Beno et al., 2020; Lücking et al., 2013; Scheldeman et al., 2006). En ese contexto, tales microorganismos son también considerados como indicadores de la calidad microbiológica del producto procesado (Burgess et al., 2010).

Por otro lado, la habilidad bacteriana de adherirse a las superficies tanto naturales como sintéticas, es considerada como una estrategia de supervivencia a ambientes hostiles, siendo el resultado de la unión exitosa y el crecimiento de los microorganismos en una superficie (Sadiq et al., 2017; Marchand et al., 2012). En conexión con esto, las bacterias formadoras de esporas pueden adherirse a las superficies de acero inoxidable y otros materiales utilizados en el procesamiento de la leche, formando biopelículas (Ostrov et al., 2016). Es decir, comunidades microbianas inmersas en una matriz protectora formada por exopolisacáridos (Donlan, 2002). Dentro de una biopelícula, las bacterias son capaces de desarrollarse bajo anoxia ambiental y limitación de nutrientes al mostrar un metabolismo reducido, expresión génica y producción de proteínas, propios de esas condiciones, lo que puede conducir a una tasa de división celular disminuida (Parkar et al., 2003). Así, esta forma de vida promueve, aún más, la supervivencia de bacterias que pueden resultar patógenas y también asociarse a la descomposición del producto comercial, debido a la coagulación de proteínas y la alteración de sus propiedades organolépticas (de Jonghe et al., 2010; Marchand et al., 2012; Burgess et al., 2010). La transición de células en estado planctónico a biopelículas es desencadenada por una gran variedad de componentes, ya sean ambientales o fisiológicos, como el *quorum sensing* o bien la disponibilidad de nutrientes y el estrés osmótico (Marchand et al., 2012). Factores que también determinarán el modelo de

biopelícula que se forme, dado que, existen diversas formas de biopelículas e inclusive una sola bacteria puede llegar de producir diferentes tipos de las mismas. Dentro de este contexto, el tipo de biopelículas que se forme puede verse influenciado por el material que entra en contacto con la leche y del mismo modo, la composición de la leche puede afectar la adhesión bacteriana (Cherif-Antar et al., 2016).

De esta manera, la estructura de las biopelículas no solo favorece la supervivencia de bacterias esporuladas, sino también de especies que únicamente forman células vegetativas. En relación con esto, el tiempo de tránsito de la leche durante su procesamiento suele ser inferior a 30 minutos. Debido a las limitaciones de temperatura y/o viscosidad del flujo del producto, es poco probable que las bacterias tanto mesófilas como termófilas se multipliquen en todos los pasos de la línea de procesamiento. Por lo tanto, el número de estas bacterias no aumentará significativamente en el producto procesado durante su manufactura, pero si se considera que la presencia y supervivencia, se deriva de las biopelículas en la línea de procesamiento (Abd et al., 2014). Por ejemplo, bacterias sensibles a elevadas temperaturas como *Pseudomonas* spp. y *Listeria* spp., generalmente forman biopelículas en las tuberías y silos que anteceden a la pasteurización, mientras que, en las superficies expuestas al calor, debido a la termorresistencia incrementada, estas comunidades están formadas por organismos mesofílicos o termofílicos como *Bacillus* spp. y géneros relacionados, además de bacterias no esporuladas como miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., y bacterias del ácido láctico como *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp. y *Pediococcus* spp. entre otras (Marchand et al., 2012). Por lo tanto, la formación de biopelículas constituye un reservorio de células bacterianas, en su forma vegetativa o esporulada y consecuentemente una fuente importante de contaminación cruzada en la línea de procesamiento del alimento (Huang et al., 2021).

Aunque dentro de las biopelículas pueden coexistir múltiples especies bacterianas, las superficies de equipos en plantas de fabricación de productos lácteos tienden a ser colonizadas por las biopelículas de una sola especie (Parkar et al., 2003). Este aspecto, sugiere que la contaminación bacteriana, se origina fundamentalmente a partir de biopelículas formadas en las superficies de los equipamientos requeridos para el procesamiento industrial de la leche (Parkar et al., 2003). De ahí el énfasis en la limpieza *in situ* en la industria

La limpieza de los equipos en plantas de fabricación de lácteos es importante para eliminar las biopelículas, mantener la calidad del producto y reducir las pérdidas de energía que pueden ocurrir debido a la colonización extensa de biopelículas (Parkar et al., 2003). De manera similar, se conoce la existencia de tratamientos que pueden reducir notablemente la formación de biopelículas. Por ejemplo, se ha podido demostrar que la adición de magnesio (Mg) a la leche inhibe la formación de biopelículas por especies de *Bacillus* spp. y reduce significativamente el deterioro de los productos lácteos (Ben-Ishay et al., 2017). Este fenómeno se fundamenta en la inhibición específica de la transcripción de genes involucrados en la formación de biopelículas mediante la acción de iones magnesio (Ben-Ishay et al., 2017).

Si bien es cierto, el desarrollo de biopelículas en las superficies de fabricación de lácteos y, consecuentemente, las bacterias relacionadas a estas son indeseables, no todas conllevan a la degradación del producto. En tal contexto, en Ecuador no existen estudios publicados sobre la capacidad formadora de biopelículas de bacterias mesófilas y termófilas asociadas a la cadena productiva de la leche UHT. Considerando, que dicha capacidad constituye un aspecto fundamental relacionado al potencial de degradación de los productos lácteos comerciales, la presente propuesta de investigación evaluó la capacidad formadora de biopelículas de distintas bacterias mesófilas y termófilas aisladas de leche cruda, pasteurizada y procesada mediante tratamiento de ultra alta temperatura (UHT), de una industria local. Adicionalmente, se investigó la respuesta a cloruro de magnesio 5 mM, como agente inhibidor del desarrollo de biopelículas. Considerando que en esta investigación se utilizaron aislamientos nativos de la industria local, los resultados obtenidos permiten conocer la potencial capacidad de colonizar superficies de acero inoxidable de las plantas de procesamiento, formando biopelículas y constituyen una base importante para el desarrollo de estrategias de prevención de la formación de biopelículas en las distintas superficies utilizadas en la industria láctea.

Por ello, esta propuesta de investigación pretende responder a las siguientes interrogantes: i) ¿todas las cepas estudiadas tienen la misma capacidad de formación de biopelículas? ii) ¿las esporas, de las cepas estudiadas, provenientes de biopelículas exhiben una respuesta diferente a aquella de las esporas planctónicas, con respecto a la exposición a elevadas temperaturas y iii) ¿la adición de cloruro de magnesio al medio de cultivo, inhibe o reduce la formación de biopelículas por las cepas estudiadas?

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Analizar la capacidad, in vitro, de formación de biopelículas de bacterias mesofílicas y termofílicas, previamente aisladas de leche cruda, pasteurizada y procesada mediante tratamiento de ultra alta temperatura (UHT).

4.2 ESPECÍFICOS

- a) Comparar la capacidad formadora de biopelículas de los grupos bacterianos aislados de la leche.
- b) Evaluar la respuesta de esporas originarias de biopelículas a la exposición a elevadas temperaturas.
- c) Evaluar la respuesta, en términos de formación de biopelículas, de bacterias aisladas de leche frente a compuestos inhibitorios como cloruro de magnesio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CEPAS BACTERIANAS

Las diecinueve cepas de bacterias, quince mesófilas y cuatro termófilas, que se incluyeron en este estudio, fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de alimentos de la carrera de Microbiología de la PUCE. Estas fueron previamente aisladas a partir de muestras de leche cruda, pasteurizada y procesada por ultra alta temperatura (UHT). A partir de cultivos crío preservados en caldo BHI más glicerol 20% (v/v) a -20 °C, las cepas seleccionadas fueron reactivadas en agar nutriente, a la temperatura y tiempo de crecimiento óptimo de cada aislamiento. La pureza de los cultivos fue comprobada observando el desarrollo de un solo morfotipo colonial en el medio de cultivo de reactivación, además de las características microscópicas exhibidas de manera uniforme. Con el fin de construir una colección de cultivos de trabajo, las cepas bacterianas fueron propagadas en 5 mL de caldo BHI, bajo los parámetros óptimos de crecimiento. Subsecuentemente, se adicionó glicerol hasta alcanzar una concentración final de 20% (v/v) y alícuotas de 1 mL fueron preservados a -20 °C (Huang et al., 2021).

5.2 TAMIZAJE DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS DE POLIESTIRENO

Para determinar la habilidad de las cepas seleccionadas de formar biopelículas, se utilizaron placas translúcidas de poliestireno, de 96 micropocillos con fondo plano. El ensayo se realizó en tres réplicas por cada cepa microbiana. Para esto, en cada pocillo se colocaron 200 µL de caldo BHI estéril y se adicionaron 20 µL de cultivo líquido, en fase logarítmica (18 – 24 h de incubación) de las bacterias seleccionadas. Esta suspensión, fue incubada por 24 horas a 35° y 55 °C para bacterias mesófilas y termófilas, respectivamente. Como control negativo, se dispensaron 220 µL de medio BHI en tres pocillos individuales. Posteriormente, el contenido de los pocillos fue descartado y estos se enjuagaron por 3 veces con agua Milli-Q. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y la biomasa formada fue fijada adicionando 220 µL de metanol puro que se dejó reposar durante 10 minutos en los pocillos. Luego de descartar el líquido y secar los pocillos, se colocaron 220 µL de solución de cristal violeta 0.05% en cada pocillo y las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. El colorante se descartó y luego del

secado, se enjuagaron los pocillos con agua Milli-Q. Nuevamente, las placas se secaron a temperatura ambiente, para posteriormente, dispensar 220 μL de alcohol – acetona (50% - 50% v/v) en cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos (Figura 1). Esta solución, se trasvasó en una nueva placa de poliestireno y se midió, espectrofotométricamente, su densidad óptica a 492nm ($\text{DO}_{492\text{nm}}$) de longitud de onda. El valor del punto de corte se definió por tres desviaciones estándar por encima del promedio de la $\text{DO}_{492\text{nm}}$ de los pocillos correspondientes al control negativo (Alonso et al., 2021; Sadiq et al., 2017).

5.3 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN PRESENCIA DE CLORURO DE MAGNESIO COMO AGENTE INHIBIDOR

Las cepas que exhibieron la capacidad de formación de biopelículas fueron seleccionadas para este ensayo. Para esto, se siguió la metodología delineada en el apartado 5.2 con una única variación que consistió en la adición de MgCl_2 , con una concentración final de 5mM, al medio de cultivo.

5.4 ENSAYO DE ADHERENCIA A SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE SUMERGIDAS EN LECHE

Para el siguiente ensayo se utilizó la técnica descrita por Sadiq et al. (2017), mediante la cual se pudo determinar la capacidad de las bacterias de formar biopelículas en superficies de acero inoxidable. Brevemente, frascos de vidrio con 100 mL de leche descremada estéril, fueron llevados a baño maría por 30 minutos a una temperatura de 90 °C, para asegurar su esterilidad. Posteriormente, se inocularon, de forma individual, cultivos de las cepas bacterianas incubadas durante la noche para alcanzar una concentración final de 10^3 - 10^4 UFC/ml. Se utilizaron placas de acero inoxidable (grado 316; 1 cm^2 ; acabado 2B), las cuales fueron previamente lavadas con detergente para retirar cualquier residuo de grasa y posteriormente esterilizadas mediante autoclave. Tres de estas placas fueron sumergidas en cada uno de los frascos de vidrio con desarrollo de los aislamientos evaluados en leche descremada. Estos fueron llevados a incubación con agitación por 24 horas a 100 rpm a temperaturas de 37 °C y 55 °C para mesófilos y termófilos, respectivamente.

Subsecuentemente, se desagregaron las células adheridas a las placas de acero inoxidable. Con este propósito, de manera aséptica y con pinzas estériles, se retiraron las placas sumergidas en leche y cada una de estas se enjuagó con agua MilliQ estéril (Figura 2). Estas fueron colocadas individualmente en tubos cónicos de 50 ml que contenían 10 ml de tampón de fosfato (PBS) y 5 g de perlas de vidrio estériles. Inmediatamente, esta preparación se agitó en un vórtice a 3000 rpm durante 2 minutos. El contenido de los frascos de vidrio con las células desprendidas se diluyó en microtubos en agua peptonada al 0,1% y se realizó diluciones hasta 10^{-4} . Del mismo modo a partir del cultivo en leche se realizó diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . Estas suspensiones fueron inoculadas, por separado, mediante el método de microgota en cajas Petri con medio TSA (Figura 2).

5.5 PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE ESPORAS

Se siguió la metodología descrita por Huang et al., (2021) con ligeras modificaciones. Brevemente, las esporas de biopelículas formadas, sobre la superficie de 4 placas de acero inoxidable, como se indica en la sección 5.4, se recolectaron después de 4 días de incubación (Figura 5). Se recuperó una alícuota de leche de cada muestra para los experimentos subsecuentes. Para recuperar la mayor cantidad de esporas, la biomasa de las biopelículas, se retiró las placas de acero inoxidable de manera aséptica con pinzas estériles y se enjuagó cada una con agua Milli-Q, tras el enjuague se las dejó secar por 5 minutos en placas Petri de vidrio estériles. Seguido de esto, se colocó las cuatro placas de cada muestra en un tubo cónico con PBS y perlas de vidrio y se agitó mecánicamente con un vórtice a 3000 rpm por 2 minutos. Por otra parte, las esporas planctónicas fueron recuperadas a partir del desarrollo libre en el volumen de leche de los cultivos preparados anteriormente. Las suspensiones obtenidas fueron recuperadas en nuevos tubos cónicos y fueron llevados a centrifugación a 6500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Subsecuentemente los sedimentos se lavaron dos veces con PBS y la suspensión de esporas se resuspendió en 1 ml de PBS y se almacenó a 20 °C hasta la siguiente prueba.

5.6 RESISTENCIA DE LAS ESPORAS AL CALOR

En esta técnica se adicionaron cincuenta microlitros de suspensión de esporas de cultivo de planctónico o de biopelícula, de cada una de las cepas evaluadas, en microtubos cónicos. Como control positivo, se utilizó un microtubo adicional por cada muestra, el cual fue tomado como

recuento inicial de esporas, y se calentó con ayuda de un termobloque a 80 °C por 10 minutos. Las demás muestras se calentaron a intervalos regulares de 90 °C por 15 minutos de la misma manera en un termobloque. Subsecuentemente, se realizaron diluciones seriadas con base 10 hasta 10^{-5} para las esporas de cultivo planctónico y desde 10^{-1} hasta 10^{-4} para espore recuperadas de biopelículas. Del mismo modo, que en el punto 5.4, 10 µL de estas diluciones se inocularon por el método de microgota en cajas Petri con medio TSA y se incubaron a 30 °C por 3 días. Finalmente se realizó un recuento en UFC/mL para esporas planctónicas y en UFC/cm² para esporas de biopelículas.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los ensayos experimentales se realizaron por triplicado. La DO_{492nm} , en función de la capacidad formadora de biopelículas, de las cepas seleccionadas en ausencia y presencia de un agente inhibidor, fue comparada estadísticamente mediante ANOVA unidireccional (prueba de comparación múltiple de Tukey) para determinar si las diferencias entre los resultados de las diferentes cepas fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$). El mismo análisis estadístico se aplicó para comparar los resultados relacionados a las distintas cepas en los ensayos de desarrollo planctónico y de biopelículas en leche, además de la respuesta de diferentes cepas a la exposición a 90 °C. Por otra parte, la capacidad de formación de biopelículas de una misma cepa en ausencia y presencia de un agente inhibidor fue comparada mediante la prueba t de Student, con un nivel de significancia del 0.05%. Asimismo, la resistencia al calor de esporas planctónicas y encapsuladas en biopelículas también se comparó mediante esta última prueba.

6. RESULTADOS

6.1 TAMIZAJE DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS DE POLIESTIRENO Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN PRESENCIA DE CLORURO DE MAGNESIO COMO AGENTE INHIBIDOS

Con base en el punto de corte (PC), cuyo valor para bacterias de crecimiento mesofílico se estableció en 0,194, se determinó que la DO_{492nm} de doce de las quince cepas evaluadas, fue superior al mismo PC, y consecuentemente, fueron capaces de formar biopelículas. Entre estas, *Staphylococcus pasteurii* RE1.9, exhibió la mayor capacidad formadora de biopelículas dentro de este grupo, con una DO_{492nm} de $0,337 \pm 0,027$, teniendo diferencia estadísticamente significativa frente a 10 cepas (Tabla 1), mientras que en comparación con *Pantoea conspicua* P.40, *Pseudomonas azotoformans* C8.30, *Raoultella terrigena* E7.12 y *Enterococcus durans* E12.33, no hubo una diferencia significativa. La siguiente cepa con mayor capacidad de formar biopelículas fue *Enterococcus durans* E12.33, con una DO_{492nm} de $0,317 \pm 0,006$, la misma que fue significativamente mayor ($P < 0.05$) con respecto a la DO_{492nm} de *Pantoea conspicua* P.39 y D.23, *Pantoea deleyi* C11.35 (no formadora de biopelículas), *Staphylococcus epidermidis* E3.6, *Enterobacter hormaechei* E5.8, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20, *Enterococcus durans* E10.19 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* D.24.

Del mismo modo, se observó que dos de las cuatro cepas termofílicas también exhibieron capacidad de formar biopelículas en los pocillos de poliestireno (Tabla 2). En este ensayo el PC tuvo un valor de 0.264. Con base en esto, *Bacillus licheniformis* SDP.15, fue la cepa que mostró mayor capacidad de formar biopelículas, con una DO_{492nm} de 0.416 ± 0.057 . Este valor, presenta una diferencia estadísticamente significativa frente a las tres cepas restantes. Es importante destacar que, entre estas, *Bacillus sonorensis* C4.13 no exhibió capacidad formadora de biopelículas.

Con respecto a la inhibición de biopelículas en presencia de $MgCl_2$ 5 mM, solamente tres de las doce cepas mesofílicas que anteriormente mostraron capacidad formadora de biopelículas (Tabla 1), no fueron inhibidas, ya que su DO_{492nm} fue superior al PC calculado para este ensayo (0.208). Estas fueron *Pseudomonas azotoformans* C8.30, *Dermacoccus nichinomiyaensis* C1.1 y *Raoultella terrigena* E7.12 y, aunque estas presentaron una reducción en la DO_{492nm} , únicamente

la absorbancia de la última exhibió una reducción estadísticamente significativa en conexión con la exposición al agente inhibidor. Asimismo, entre las cepas termófilas, *Bacillus licheniformis* SDP.15, no fue inhibida en presencia de MgCl₂ 5 mM (Tabla 2). No obstante, su DO_{492nm} fue reducida significativamente. Adicionalmente, al comparar la DO_{492nm} de los aislamientos en ausencia y presencia del inhibidor, se observó una reducción estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en la capacidad formadora de biopelículas en siete cepas. Esto incluye a *Pantoea conspicua* D.23, *Pseudomonas azotoformans* C8.30, *Staphylococcus pasteurii* RE1.9, *Enterobacter hormaechei* E8.16, *Raoultella terrigena* E7.12, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* D.24 y *Enterococcus durans* E12.33.

Tabla 2 Capacidad formadora de biopelículas en ausencia y presencia de MgCl₂ 5 mM de bacterias termófilas

| Cepa | DO _{492nm} sin inhibidor | DO _{492nm} con inhibidor | Origen del aislamiento |
|-----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Bacillus sonorensis</i> C4.13 | 0,235 ± 0,023 | NF | Leche cruda |
| <i>Bacillus licheniformis</i> SDP.15 | 0,416 ± 0,057 ^{*a} | 0,317 ± 0,006 ^c | Leche pasteurizada semidescremada |
| <i>Enterococcus durans</i> E1.4 | 0,284 ± 0,072 ^{*b} | 0,047 ± 0,002 | Leche entera PT |
| <i>Bacillus licheniformis</i> E9.17 | 0,218 ± 0,074 | NF | Leche entera PT |

Cada valor corresponde a la media ± la desviación estándar de la DO_{492nm} en los tratamientos con y sin inhibidor. * DO_{492nm} superior al PC (0.264) = Cepas con capacidad formadora de biopelículas. ^a Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con todas las cepas. ^b Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con *Bacillus licheniformis* SDP.15. ^c Cepa que no fue inhibida en presencia de MgCl₂ 5 mM. NF= no se evaluó por no ser formadora de biopelículas. PT = Producto terminado

6.2 ENSAYO DE ADHERENCIA DE BIOPELÍCULAS A SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE SUMERGIDAS EN LECHE

Con respecto a la concentración de células planctónicas recuperadas a partir de leche, la cepa que alcanzó el mayor recuento fue *Pantoea conspicua* P40, con un valor de $9 \pm 0.6 \times 10^8$ UFC/mL. Por otra parte, la cepa con recuento más elevado de células de biopelículas recuperadas a partir de las placas de acero inoxidable fue *Staphylococcus epidermidis* E3.6, con un valor de $6.45 \pm 1.8 \times 10^7$ UFC/cm², contrario al recuento de células planctónicas de esta misma cepa, el cual fue uno de los más bajos $4.9 \pm 0.9 \times 10^8$ UFC/mL (Tabla 3). Por otra parte, en las cepas de crecimiento termofílico, el recuento de células planctónicas de *Enterococcus durans* E1.4, es significativamente mayor al de *Bacillus licheniformis* SDP.15. Sin embargo, en el recuento de células de biopelículas no existe diferencia estadísticamente significativa entre las cepas (Tabla 4).

Tabla 4 Recuento de células planctónicas en leche y de células de biopelículas en placas de acero inoxidable de bacterias termófilas

| Cepa | Recuento de células planctónicas UFC/ mL | Recuento de células en biopelículas UFC/cm ² |
|--------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i> SDP.15 | $1.8 \pm 0.05 \times 10^8$ ^a | $4.8 \pm 0.4 \times 10^6$ |
| <i>Enterococcus durans</i> E1.4 | $3.6 \pm 0.05 \times 10^8$ | $1.6 \pm 0.07 \times 10^5$ |

Los valores numéricos corresponden a la media del recuento de tres réplicas de células planctónicas y células de biopelículas \pm la desviación estándar de los mismos. ^a Diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) con *Enterococcus durans* E1.4.

6.3 RESISTENCIA DE LAS ESPORAS AL CALOR

En este ensayo, *Bacillus sonorensis* C4.13 y *Bacillus licheniformis* SDP.15, alcanzaron la misma concentración inicial de esporas a partir del cultivo en leche (8.6×10^4 UFC/mL). Sin embargo, tras el tratamiento térmico a 90 °C, no hubo una diferencia estadísticamente significativa para ninguna de las dos cepas. Del mismo modo, en los recuentos de esporas recuperadas a partir

de las biopelículas, tampoco se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa luego del tratamiento térmico (Tabla 5).

Tabla 5 Recuento de esporas bacterianas luego de tratamiento térmico a 80 o 90 °C

| Cepa | Recuento control en leche 80 °C UFC/mL | Recuento tratamiento en leche 90 °C UFC/mL | Recuento control en biopelículas 80 °C UFC/cm ² | Recuento tratamiento en biopelículas 90 °C UFC/cm ² |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <i>Bacillus sonorensis</i> C4.13 | 8.6 ± 0.1 x10 ⁴ | 9.3 ± 0.1 x10 ⁴ | 3.17 ± 0.05 x10 ⁵ | 4.08 ± 0.1 x10 ⁵ |
| <i>Bacillus licheniformis</i> SDP.15 | 8.6 ± 0.06 x10 ⁴ | 6 ± 0.1 x10 ⁴ | 3.33 ± 0.05 x10 ⁵ | 3.83 ± 0.1 x10 ⁵ |

Los valores numéricos corresponden a la media del recuento de tres réplicas de esporas expuestas a 80 o 90 °C ± la desviación estándar de los mismos.

7. DISCUSIÓN

En este estudio, se evaluó la capacidad de formar biopelículas en superficies de poliestireno, con caldo BHI como medio de propagación, y en placas de acero inoxidable sumergidas en leche descremada. Para esto se utilizaron 19 cepas bacterianas, entre ellas 15 de crecimiento mesofílico y 4 de crecimiento termofílico. Inicialmente, como se puede observar en la Tabla 1, se pudo evidenciar gran variabilidad entre la capacidad formadora de biopelículas de las distintas cepas evaluadas. Esto se puede atribuir a varios factores como el medio de cultivo, el tipo de superficie, la temperatura e incluso el tipo de pared celular, ya sea, Gram-positiva o Gram-negativa. En este contexto, los ácidos teicoicos son una clase importante de glicopolímeros de superficie que se encuentran comúnmente en la pared celular de las bacterias Gram-positivas (Hoong Teh et al., 2015). Estas estructuras también desempeñan un papel importante en la unión celular y en la formación de biopelículas, dado que la carga de la superficie celular creada por los ácidos teicoicos de la pared, es esencial para la unión inicial de las bacterias a las superficies (Gross et al., 2001). Con base en los resultados obtenidos, 12 de las 15 cepas de crecimiento mesofílico fueron capaces de formar bioelículas, de las cuales la mitad son Gram-positivas. En este grupo se incluye a *Staphylococcus pasteurii* RE1.9, *Staphylococcus epidermidis* E3.6, *Dermacoccus nishinomiyaensis* C1.1, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* D.24 y *Enterococcus durans* E12.33. En conexión con esto, Weber et al. (2019) indica que la presencia de biopelículas en materiales utilizados frecuentemente en la maquinaria de ordeño y en las plantas de procesamiento de productos lácteos, como son el acero inoxidable y el plástico, están constituidas mayoritariamente por bacterias Gram-positivas.

Por otra parte, el origen de los aislamientos bacterianos, también se encuentra estrechamente relacionado con la capacidad formadora de biopelículas de cada cepa. Así pues, algunos de los microorganismos presentes en los silos de almacenamiento de leche cruda, tienen la capacidad para producir enzimas proteolíticas y lipolíticas que pueden tener un efecto negativo en la calidad del producto (Flach et al., 2014). En este contexto, entre las cepas de crecimiento mesofílico, incluidas en la presente investigación, tres son originarias de leche cruda, dentro de las cuales únicamente *Dermacoccus nishinomiyaensis* C1.1 presentó capacidad formadora de biopelículas, en contraste con *Pantoea deleyi* C11.35 y *Enterococcus durans* E10.19 que no presentaron esta propiedad. Del mismo modo, entre las cepas de crecimiento termofílico *Bacillus sonorensis* C4.13,

proveniente de leche cruda, tampoco exhibió capacidad formadora de biopelículas. En relación con esto, una de las razones por la cual la adherencia en superficies de acero inoxidable es reducida, puede deberse a que las células bacterianas planctónicas compiten con las proteínas del suero de la leche, por los sitios de unión en este tipo de superficies (Hoong Teh et al., 2015). Por otra parte, durante la pasteurización, las placas intercambiadoras de calor son un sitio ideal para el desarrollo de biopelículas, debido a que poseen una gran superficie y son zonas de temperatura apropiadas para una amplia variedad de bacterias (Flint et al., 2020). En este estudio, *Pantoea conspicua* P.40 y *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20, bacterias de crecimiento mesofílico, aisladas a partir de leche pasteurizada, presentaron capacidad formadora de biopelículas, mientras que *Pantoea conspicua* P.39 no mostró esta propiedad. Dentro de las cepas termofílicas, la única proveniente de leche pasteurizada fue *Bacillus licheniformis* SDP.15. De forma interesante, esta cepa presentó la mayor capacidad formadora de biopelículas dentro de este grupo. En relación con esto, las placas intercambiadoras de calor se describen como el sitio más probable para la formación de biopelículas, durante la línea de procesamiento de leche, y también se ha reportado como una fuente de contaminación por *B. licheniformis* (Flint et al., 2020).

Además, se pudo observar variabilidad entre la capacidad de formar biopelículas entre aislamientos de diferentes especies y además entre cepas de la misma especie. Por ejemplo, *Enterococcus durans* E12.33 fue una de las cepas de crecimiento mesofílico con mayor capacidad formadora de biopelículas, en contraste con *Enterococcus durans* E10.19 que no presentó esta característica. Al mismo tiempo, *Enterococcus durans* E1.4, la cual fue catalogada como cepa de crecimiento termofílico, también exhibió capacidad formadora de biopelículas. Aunque estos resultados ratifican la variabilidad de la capacidad evaluada, entre cepas de la misma especie, sería conveniente analizar a todas las cepas individualmente a 35 y 55 °C, con el fin de corroborar que este fenómeno sea influenciado por la temperatura.

También en esta investigación, se evidenció que una elevada capacidad de formación de biopelículas, de las cepas evaluadas, en las placas de poliestireno, no necesariamente se reflejó en una alta concentración de células adheridas en placas de acero inoxidable. Por ejemplo, se pudo observar que *Staphylococcus pasteurii* RE1.9 y *Staphylococcus epidermidis* E3.6, exhibieron capacidad formadora de biopelículas sobre ambas superficies. Esto se ha demostrado en múltiples estudios en los que muchas cepas de *Staphylococcus* spp., han presentan una capacidad, entre

moderada a fuerte de formar biopelículas, debido a que frecuentemente las especies de estafilococos albergan genes *ica*, relacionados a la producción de adhesina intercelular de polisacáridos (PIA) y N-acetilglucosamina (PNAG), polímeros que participan en la formación de biopelículas (O’Gara, 2007; Gutiérrez et al., 2012). No obstante, mientras *Staphylococcus pasteurii* RE1.9 exhibió la mayor absorbancia en las placas de poliestireno, no fue la cepa que alcanzó mayor recuento obtenido a partir de las placas de acero inoxidable. Tomando en cuenta que, para el desarrollo en las placas de poliestireno se utilizó caldo BHI, con una fórmula rica en nutrientes (Cruzado-Bravo et al., 2018), mientras que para las placas de acero inoxidable se utilizó leche descremada, la cual proporcionó las condiciones apropiadas que pueden ser aprovechadas fácilmente por las bacterias. En ese sentido, es necesario considerar que las cepas utilizadas en el presente estudio fueron aisladas de diferentes muestras de leche y en otras investigaciones se ha descrito que la mayoría de las bacterias aisladas de esta matriz poseen numerosas enzimas que les permiten adaptarse rápidamente a su entorno, facilitando así la absorción de nutrientes disponibles (Cruzado-Bravo et al., 2018). Por lo tanto, aunque los medios de cultivo utilizados no representan un inconveniente en el desarrollo bacteriano, las cepas probadas en este estudio podrían tener una adaptación específica para desarrollarse en leche. En relación con esto, la afinidad de cada cepa por formar biopelículas puede deberse a la desnaturalización y agregación de las proteínas presentes en el suero de la leche, que se da durante los tratamientos de calor por encima de los 65 °C, dando paso a una rápida adherencia de las proteínas, lo que puede provocar cambios en las propiedades de la superficie del acero inoxidable, aumentando la probabilidad de que las bacterias se adhieran a las mismas (Marchand et al., 2012). Además, la estructura química del exopolisacárido varía entre los diferentes tipos de organismos y, al mismo tiempo, depende de las condiciones ambientales, incluyendo las superficies con las que los microorganismos pueden establecer contacto (Venter et al., 2014).

Según Marques et al. (2007), el número de células adheridas y desarrolladas debe ser de 6 y 7 log UFC/cm² para que ocurra la formación de biopelículas. Valores menores a esto indican únicamente procesos de adhesión (Marques et al., 2007). En contraste con esto, la mayoría de las cepas de crecimiento mesofílico analizadas en este estudio, alcanzaron un recuento de entre 3 y 5 log UFC/cm², con excepción de *Staphylococcus epidermidis* E3.6, *Enterobacter hormaechei* E8.16, *Raoultella terrigena* E7.12, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* D.24 y *Enterococcus durans* E12.33

(Tabla 3), las mismas que tuvieron un recuento de 6 y 7 log UFC/cm². En relación con esto, los recuentos con log menores a 6 UFC/cm² nos indican que, si bien existe un proceso de adherencia, posiblemente un tiempo más prolongado de incubación, fomentaría la formación y a su vez la conformación de biopelículas más complejas y resistentes. Del mismo modo, dentro de las cepas de crecimiento termofílico, *Bacillus licheniformis* SDP.15 obtuvo un recuento de 6 log UFC/cm², mientras que, el de *Enterococcus durans* E1.4 fue de 5 log UFC/cm².

Por otro lado, entre los resultados del estudio realizado por Ben-Ishay et al. (2017), se reportó que la suplementación de la leche con MgCl₂ 3 mM afectó ligeramente la formación de biopelículas de *Bacillus* spp., mientras que las concentraciones de 5 mM y superiores inhibieron completamente la formación de tales comunidades por los mismos organismos. Sorprendentemente, de las cuatro cepas que no fueron inhibidas por el MgCl₂ 5 mM, *Bacillus licheniformis* SDP.15 fue la que presentó mayor resistencia al inhibidor. El efecto de esta sal, y su fundamento, ha sido descrito únicamente en biopelículas de bacterias Gram positivas, formadoras de esporas. Sin embargo, en la presente investigación el efecto inhibitorio del MgCl₂ a una concentración de 5 mM, sobre la formación de biopelículas, pudo ser comprobado, no solamente en las cepas Gram-positivas, sino también en aislamientos de bacterias Gram-negativas. Además, en el estudio de Ben-Ishay et al. (2017) para confirmar que la inhibición de la formación de biopelículas, por los iones de Mg²⁺, no se deba al estrés osmótico para las células bacterianas, se probó el efecto de diferentes concentraciones en el análisis de la curva de crecimiento bacteriano. De esta manera, los resultados obtenidos sugirieron que no hubo un efecto significativo de los iones Mg²⁺ en el crecimiento bacteriano en las concentraciones probadas (Ben-Ishay et al., 2017). En ese contexto, el porcentaje de MgCl₂ utilizado en nuestro estudio fue de 0.048%, lo que se considera relativamente bajo y consecuentemente, no afectaría el crecimiento bacteriano. En relación al efecto inhibitorio del MgCl₂ 5 mM sobre biopelículas de bacterias Gram-negativas, no se registra una concentración que influya de manera significativamente negativa el desarrollo de las bacterias por estrés osmótico. Sin embargo, se ha reportado que, cuando la concentración de sal supera una concentración 1,25 M, las células no muestran proliferación y la tasa de muerte celular aumenta significativamente (Nepal y Kumar, 2020). Por lo tanto, concluimos que el mecanismo de acción de los iones Mg²⁺ es particularmente relevante para la inhibición de la formación de biopelículas.

Con respecto a la resistencia de las esporas al calor, no se reflejaron diferencias estadísticamente significativas entre el recuento inicial a 80 °C y el recuento luego del tratamiento térmico a 90 °C, en ninguna de las cepas estudiadas (Tabla 5). En conexión con esto, las esporas de *B. licheniformis* pueden resistir la pasteurización, pero no parecen germinar ni crecer en las líneas de procesamiento (Hoong Teh et al., 2015). Esto debido a que, por lo general las esporas de las especies de *Bacillus* spp., requieren de activación para lograr la máxima germinación, esta activación es un tratamiento térmico subletal y, dependiendo de la especie, la temperatura óptima es de 60-100 °C (Ghosh et al., 2009). Estas esporas también son muy tolerantes al calor húmedo y, por lo general, requieren temperaturas de 80 a 110 °C para inactivar rápidamente las esporas (Ghosh et al., 2009). Cabe mencionar que, las bacterias formadoras de esporas son contaminantes importantes dentro de la industria láctea, ya que pueden tener un impacto significativo en la calidad y seguridad de los alimentos (Lücking et al., 2013).

8. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio, se demostró que existe variabilidad en la capacidad de formar biopelículas, no solamente entre las distintas especies bacterianas, sino también entre cepas de la misma especie.
2. Las cepas con capacidad formadora de biopelículas, representan un riesgo, sobre todo en la pasteurización, debido a las temperaturas manejadas en esta etapa.
3. Adicionalmente, el efecto inhibitor del $MgCl_2$ 5 mM, que ha sido descrito, principalmente, en especies de *Bacillus* spp., pudo ser comprobado en este estudio, inhibiendo la formación de biopelículas, no solamente en cepas de bacterias Gram-positivas, sino también en Gram-negativas, lo que sugiere que este compuesto podría aplicarse en las plantas de producción de leche como una estrategia de control frente a la contaminación del alimento.
4. Por otra parte, una alta capacidad formadora de biopelículas en superficies de poliestireno, no reflejó esta característica en una misma cepa sobre superficies de acero inoxidable. Por lo que, la adherencia de cada cepa, dependerá de su afinidad con superficies hidrofílicas o hidrofóbicas.
5. Un elevado desarrollo de células planctónicas en leche, no necesariamente refleja la capacidad formadora de biopelículas de una cepa sobre superficies de acero inoxidable en contacto con esa matriz alimenticia.
6. Finalmente, las esporas de las cepas evaluadas en este estudio, mostraron elevada supervivencia al calor independientemente de haber sido recuperadas de cultivo planctónico en leche o de biopelículas y, por lo tanto, se requeriría de una temperatura superior a 90 °C para inactivarlas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd, A.-H. A., Abdula, N. I., Al, ', y Abood, A. S. (2014). Prevalence of Thermophiles and Mesophiles in Raw and UHT Milk. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(1), 23–27.
- Aguas-Mendoza, Y., Chams, L., Cury-Regino, K., Olivero-Verbel, R., y Martinez, A. (2016). Tamaño muestral para determinación de esporas termófilas responsables de acidez. *Agronomía Colombiana Suplemento*, 1.
- Ben-Ishay, N., Oknin, H., Steinberg, D., Berkovich, Z., Reifen, R., y Shemesh, M. (2017). BRIEF COMMUNICATION Enrichment of milk with magnesium provides healthier and safer dairy products. *npj Biofilms and Microbiomes*, 3, 24. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0032-3>
- Beno, S. M., Cheng, R. A., Orsi, R. H., Duncan, D. R., Guo, X., Kovac, J., Carroll, L. M., Martin, N. H., y Wiedmann, M. (2020). *Paenibacillus odorifer*, the Predominant *Paenibacillus* Species Isolated from Milk in the United States, Demonstrates Genetic and Phenotypic Conservation of Psychrotolerance but Clade-Associated Differences in Nitrogen Metabolic Pathways . *mSphere*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/msphere.00739-19>
- Burgess, S. A., Lindsay, D., y Flint, S. H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. En *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 144, Número 2, pp. 215–225). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027>
- Cempírková, R. (2007). Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors. En *Czech J. Anim. Sci* (Vol. 52, Número 11).
- Cherif-Antar, A., Moussa–Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., y Flórez, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science and Technology*, 96(1), 27–38. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0235-4>

- Cruzado-Bravo, M. L. M., Silva, N. C. C., Rodrigues, M. X., Saldaña, E., Contreras-Castillo, C. J., y Sturion, G. L. (2018). Biofilms of *Staphylococcus* spp. on stainless steel by milk and brain heart infusion broth as culture media. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 485–491. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.03>
- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P., y Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.007>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. En *Emerging Infectious Diseases* • (Vol. 8, Número 9). <http://www.microbelibrary.org/>
- Fernández, E. F., Hernández, J. A. M., Suárez, V. M., Villares, J. M. M., Yurrita, L. R. C., Cabria, M. H., y Rey, F. J. M. (2015). Documento de Consenso: Importancia nutricional y metabólica de la leche. En *Nutricion Hospitalaria* (Vol. 31, Número 1, pp. 92–101). Grupo Aula Medica S.A. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.8253>
- Flach, J., Grzybowski, V., Toniazzo, G., y Corção, G. (2014). Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. *Food Science and Technology (Brazil)*, 34(3), 571–576. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6374>
- Flint, S., Bremer, P., Brooks, J., Palmer, J., Sadiq, F. A., Seale, B., Teh, K. H., Wu, S., y Md Zain, S. N. (2020). Bacterial fouling in dairy processing. In *International Dairy Journal* (Vol. 101). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104593>
- Ghosh, S., Zhang, P., Li, Y. Q., y Setlow, P. (2009). Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. *Journal of Bacteriology*, 191(18), 5584–5591. <https://doi.org/10.1128/JB.00736-09>
- Gutiérrez, D., Delgado, S., Vázquez-Sánchez, D., Martínez, B., Cabo, M. L., Rodríguez, A., Herrera, J. J., y García, P. (2012). Incidence of *staphylococcus aureus* and analysis of

- associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8547–8554. <https://doi.org/10.1128/AEM.02045-12>
- Henriques, A. O., y Moran, C. P. (2000). Structure and Assembly of the Bacterial Endospore Coat. <http://www.idealibrary.com>
- Hoong Teh, K., Flint, S., Brooks, J., y Knight, G. (2015). Biofilms in the Dairy Industry.
- Huang, Y., Flint, S. H., y Palmer, J. S. (2021). The heat resistance of spores from biofilms of *Bacillus cereus* grown in tryptic soy broth and milk. *International Dairy Journal*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105169>
- Kmiha, S., Aouadhi, C., Klibi, A., Jouini, A., Béjaoui, A., Mejri, S., y Maaroufi, A. (2017). Seasonal and regional occurrence of heat-resistant spore-forming bacteria in the course of ultra-high temperature milk production in Tunisia. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6090–6099. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11616>
- Lorenzen, P. C., Clawin-Rädecker, I., Einhoff, K., Hammer, P., Hartmann, R., Hoffmann, W., Martin, D., Molkentin, J., Walte, H. G., y Devrese, M. (2011). A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 166–178. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00656.x>
- Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., y Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004>
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., y Herman, L. (2012). Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *En Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 11, Número 2, pp. 133–147). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x>
- Marques, S. C., Jaíne, ;, Oliveira, G., Rezende, S., Lizandra, ;, De, A., Alves, F., Belami, ;, Silva, C., Alves, ; Eduardo, Luiz, ;, De Abreu, R., y Piccoli, R. H. (2007). Formation of biofilms

- by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 538–543.
- Mckenney, P. T., Driks, A., y Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Número 1, pp. 33–44). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Nepal, S., y Kumar, P. (2020). Growth, cell division, and gene expression of *Escherichia coli* at elevated concentrations of magnesium sulfate: Implications for habitability of Europa and mars. *Microorganisms*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050637>
- O’Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 270, Issue 2, pp. 179–188). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- Ostrov, I., Harel, A., Bernstein, S., Steinberg, D., y Shemesh, M. (2016). Development of a method to determine the effectiveness of cleaning agents in removal of biofilm derived spores in milking system. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01498>
- Parkar, S. G., Flint, S. H., y Brooks, J. D. (2003). Physiology of biofilms of thermophilic bacilli - Potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 553–560. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0081-x>
- Qin, Y., Wu, G., Guo, Y., Ke, D., Yin, J., Wang, D., Fan, X., Liu, Z., Ruan, L., y Hu, Y. (2020). Engineered glyphosate oxidase coupled to spore-based chemiluminescence system for glyphosate detection. *Analytica Chimica Acta*, 1133, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.077>
- Reginensi, S., González, M., Olivera, A., Infante, I., Juliano, P., y Bermúdez, J. (2014). Microorganismos termodúricos en la leche causantes de defectos en la producción quesera. En *Int. J. Dairy Technol* (Vol. 66)

- Sadiq, F. A., Flint, S., Yuan, L., Li, Y., Liu, T. J., y He, G. Q. (2017). Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, 262, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.015>
- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., y Heyndrickx, M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 542–555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02964.x>
- Tan, I. S., y Ramamurthi, K. S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. En *Environmental Microbiology Reports* (Vol. 6, Número 3, pp. 212–225). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12130>
- Venter, S. N., Cloete, T. E., Momba, M., Kfir, R., Venter, S. N., y Cloete, T. E. (2014). An Overview of Biofilm Formation in Distribution Systems and Its Impact on the Deterioration of Water Quality Solar pasteurisation of harvested rainwater View project Identification of traits that differentiate environmental from faecal *E. coli* strains. View project An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. <https://www.researchgate.net/publication/30509585>
- Weber, M., Liedtke, J., Plattes, S., y Lipski, A. (2019). Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and -independent methods. *PLoS ONE*, 14(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222238>

10.FIGURAS

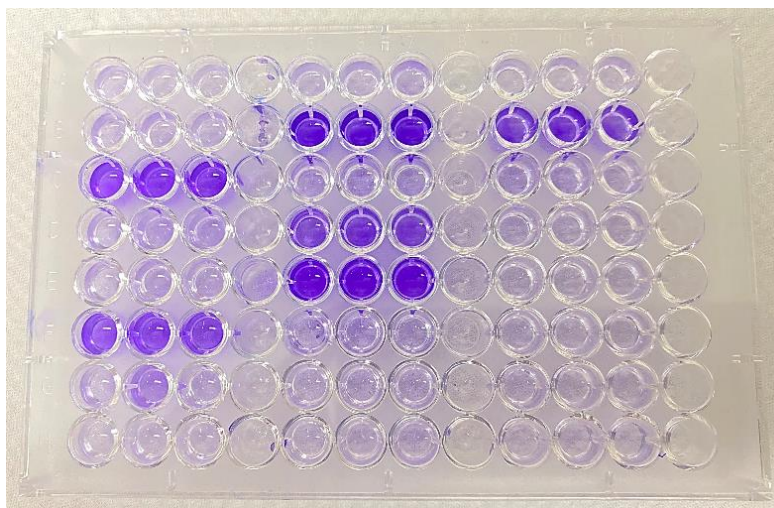


Figura 1 Extracción de cristal violeta con solución de alcohol-acetona en microplacas de poliestireno de 96 pocillos para el tamizaje de la capacidad formadora de biopelículas



Figura 2 Placa de acero inoxidable luego del enjuague con agua Mili-Q esteril, con adherencia de biopelícula

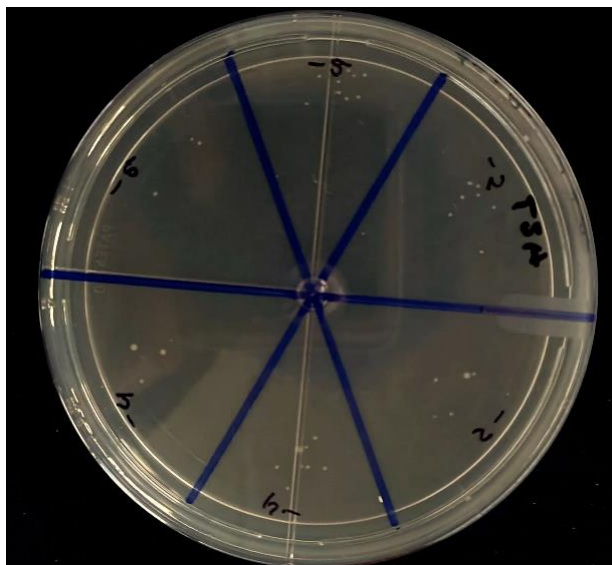


Figura 3 Crecimiento de colonias recuperadas de biopelículas, sembradas por la técnica de microgota en caja Petri con medio TSA

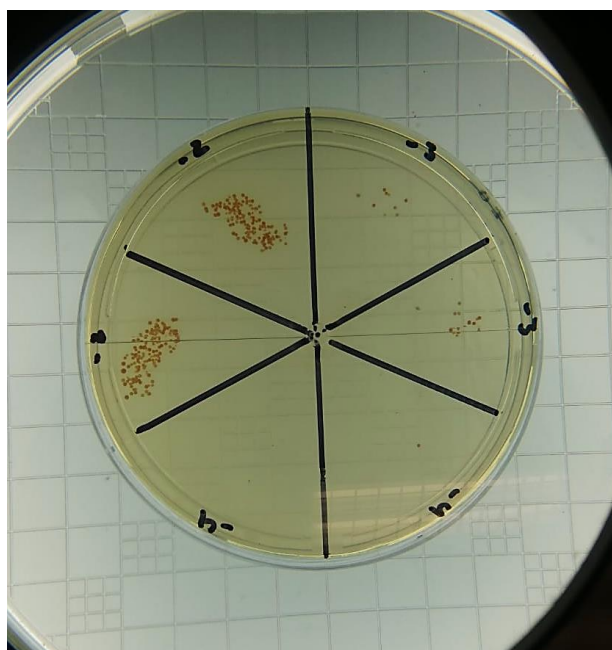


Figura 4 Crecimiento de colonias recuperadas de leche, sembradas por la técnica de microgota en caja Petri con medio TSA, en el contador de colonias



Figura 5 Cepas formadoras de esporas inoculadas en leche descremada estéril, en incubadora con agitación

11. TABLAS

Tabla 1 Capacidad formadora de biopelículas en ausencia y presencia de MgCl₂ 5 mM de bacterias mesófilas

| Cepa | DO _{492nm} | DO _{492nm} | Origen del aislamiento |
|-------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------|
| | sin inhibidor | con inhibidor | |
| <i>Pantoea conspicua</i> P.39 | 0,183 ± 0,005 | NF | Leche pasteurizada |
| <i>Pantoea conspicua</i> P.40 | 0,292 ± 0,011 ^{*d} | 0,118 ± 0,102 | Leche pasteurizada |
| <i>Pantoea conspicua</i> D.23 | 0,221 ± 0,008 ^{*hg} | 0,203 ± 0,011 | Leche descremada PT |
| <i>Pantoea deleyi</i> C11.35 | 0,177 ± 0,004 | NF | Leche cruda |
| <i>Pseudomonas azotoformans</i> C8.30 | 0,277 ± 0,011 ^{*eg} | 0,261 ± 0,009 ^f | Leche cruda |
| <i>Staphylococcus pasteurii</i> RE1.9 | 0,337 ± 0,027 ^{*ag} | 0,199 ± 0,009 | Leche entera PT |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> E3.6 | 0,205 ± 0,004 ^{*i} | 0,205 ± 0,008 | Leche entera PT |
| <i>Enterobacter hormaechei</i> E8.16 | 0,260 ± 0,007 ^{*fg} | 0,198 ± 0,004 | Leche entera PT |
| <i>Raoultella terrigena</i> E7.12 | 0,306 ± 0,002 ^{*cg} | 0,271 ± 0,008 ^f | Leche entera PT |
| <i>Enterobacter hormaechei</i> E5.8 | 0,204 ± 0,007 [*] | 0,207 ± 0,004 | Leche entera PT |

| | | | |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------|
| <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> C1.1 | 0,250 ± 0,015 ^{*f} | 0,235 ± 0,013 ^f | Leche cruda |
| <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> P2.20 | 0,194 ± 0,006 ^{*j} | 0,199 ± 0,004 | Leche pasteurizada |
| <i>Enterococcus durans</i> E10.19 | 0,147 ± 0,089 | NF | Leche entera PT |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> D.24 | 0,202 ± 0,001 ^{*g} | 0,162 ± 0,003 | Leche descremada PT |
| <i>Enterococcus durans</i> E12.33 | 0,317 ± 0,006 ^{*bg} | 0,191 ± 0,003 | Leche entera PT |

Cada valor es la media ± la desviación estándar de la DO_{492nm} en los tratamientos con y sin inhibidor.

*DO_{492nm} superior al PC (0.194) = Cepas con capacidad formadora de biopelículas (no consideradas en análisis estadísticos). ^a Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a todas las cepas con excepción de *Pantoea conspicua* P.40, *Pseudomonas azotoformans* C8.30, *Raoultella terrigena* E7.12 y *Enterococcus durans* E12.33. ^b Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a *Pantoea conspicua* D.23, *Staphylococcus epidermidis* E3.6, *Enterobacter hormaechei* E5.8, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* D.24. ^c Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a *Pantoea conspicua* D.23, *Staphylococcus epidermidis* E3.6, *Enterobacter hormaechei* E5.8, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* D.24. ^d Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a *Staphylococcus epidermidis* E3.6, *Enterobacter hormaechei* E5.8, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* D.24. ^e Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20. ^f Cepas que no fueron inhibidas en presencia de MgCl₂ 5 mM. ^g Diferencia estadísticamente significativa en presencia y ausencia de inhibidor. NF = no se evaluó por no ser formadora de biopelículas. PT = Producto terminado.

Tabla 3 Recuento de células planctónicas en leche y de células de biopelículas en placas de acero inoxidable de bacterias mesófilas

| Cepa | Recuento de células planctónicas UFC/ mL | Recuento de células en biopelículas UFC/cm ² |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <i>Pantoea conspicua</i> P40 | 9 ± 0.6 x10 ⁸ | 5 ± 0.6 x10 ⁵ |
| <i>Pantoea conspicua</i> D23 | 5.4 ± 0.8 x10 ⁸ | 1.17 ± 0.5 x10 ⁵ |
| <i>Pseudomonas azotoformans</i> C8.30 | 8.4 ± 0.2 x10 ⁸ | 4.25 ± 0.05 x10 ³ |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> E3.6 | 4.9 ± 0.9 x10 ⁸ | 6.45 ± 1.8 x10 ⁷ |
| <i>Staphylococcus pasteurii</i> RE1.9 | 8.5 ± 0.7 x10 ⁸ | 9.16 ± 1.1 x10 ⁵ |
| <i>Enterobacter hormaechei</i> E8.16 | 5.9 ± 0.6 x10 ⁸ | 2.74 ± 1.0 x10 ⁷ |
| <i>Raoultella terrigena</i> E7.12 | 1.67 ± 0.05 x 10 ⁷ ^a | 1.33 ± 0.1 x10 ⁶ |
| <i>Enterobacter hormaechei</i> E5.8 | 6.3 ± 0.1 x10 ⁵ | 2.83 ± 0.4 x10 ⁵ |
| <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> C1.1 | 6.47 ± 0.8 x10 ⁵ | 2.33 ± 0.3 x10 ⁵ |
| <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> P2.20 | 5.47 ± 1.1 x10 ⁵ ^c | 2.83 ± 0.2 x10 ⁵ |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> D.24 | 6.23 ± 0.2 x10 ⁸ | 1.63 ± 3.0 x10 ⁶ |
| <i>Enterococcus durans</i> E12.33 | 2.73 ± 0.05 x10 ⁸ ^b | 5.5 ± 2.4 x10 ⁷ |

Los valores numéricos corresponden a la media del recuento de tres réplicas de células planctónicas y células de biopelículas ± la desviación estándar de los mismos. ^a Diferencia estadísticamente significativa

($P > 0.05$) con todas las cepas a excepción de *Enterococcus durans* E12.33. ^b Diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) con todas las cepas a excepción de *Lactiseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20, *Raoultella terrigena* E7.12 y *Staphylococcus epidermidis* E3.6. ^c Diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) con *Pseudomonas azotoformans* C8.30 y *Staphylococcus pasteurii* RE1.9.

**Firma de la estudiante**

Romina Alexandra Camacho Puyol
Quito, 16 de junio de 2023

**Firma del director de disertación**

PhD. Martín Marcial Coba
Quito, 16 de junio de 2023

Firma de la coordinadora de carrera

Mgtr. Sonia Margarita Estrella Vásquez
Quito, 16 de junio de 2023