



Eliminación de biopelículas mediante antimicrobianos naturales en superficies de proceso en la industria alimentaria

Elimination of biofilms by natural antimicrobials on process surfaces in the food industry

Remoção de biofilme por antimicrobianos naturais em superfícies de processo na indústria de alimentos

Cristian José Esparza-Bonilla ^I
cristianjoss_590@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-6757-3952>

Byron Leoncio Díaz-Monroy ^{II}
bdiaz@epoch.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-3721-7994>

Ronald Henry Díaz-Arrieta ^{III}
diazronald5896@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4566-8437>

Correspondencia: cristianjoss_590@hotmail.com

Ciencias Naturales
Artículo de investigación

***Recibido:** 20 de diciembre de 2020 ***Aceptado:** 12 de enero de 2021 * **Publicado:** 08 de febrero de 2021

- I. Master Universitario en Ciencia, Seguridad y Tecnología de los Alimentos, Ingeniero en Industrias Pecuarias, Profesor Ocasional de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- II. Doctor (PhD) en Ciencias Veterinarias, Master en Biotecnología, Ingeniero Zootecnista, Profesor Titular Principal de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- III. Ingeniero en Sistemas Informáticos, Candidato a Máster Universitario en Ingeniería de Software y Sistemas Informáticos de la UNIR, España, Ecuador.

Resumen

Las biopelículas son organizaciones microbianas que se adhieren a las superficies de proceso de alimentos, son resistentes a desinfectantes, deterioran la maquinaria y contaminan los alimentos. En la Universidad de Zaragoza, se realizó este estudio para evaluar la eliminación *In vitro* de biopelículas formadas por *Escherichia coli* MG1655 y *Listeria monocytogenes* EGD-e sobre superficies de poliestireno y acero inoxidable, mediante la aplicación de aceites esenciales o sus constituyentes individuales: carvacrol, óxido de limoneno y aceite de naranja en dosis de 500 y 1000 ppm cada uno, así como la influencia del pH (4,0 y 7,0). La formación de la biopelícula se estimuló mediante cultivos en placas de 24 pocillos de acero inoxidable (AISI 304 y AISI 316) y de poliestireno en estufas de aire estático, durante 72 horas a 37°C. Luego, los tres compuestos naturales se aplicaron directamente sobre las biopelículas, mostrando distinto grado de eficacia para reducir el número de células sésiles de las dos bacterias, así el carvacrol en dosis de 1000 ppm, resultó el más eficaz, con niveles de inactivación microbiana superiores a 5 ciclos logarítmicos en superficies de acero inoxidable AISI 304 y AISI 316, sin influencia del valor del pH evaluado. El estudio demostró que las superficies de acero inoxidable favorecen la acción antimicrobiana del carvacrol en comparación con las de poliestireno, lo cual contribuye a ratificar el uso del acero inoxidable como material idóneo para superficies de proceso en contacto con alimentos, además de ofrecer una alternativa orgánica para desinfección en la industria alimentaria.

Palabras claves: Industria alimentaria; acero inoxidable; biopelícula; aceite esencial; carvacrol.

Abstract

Biofilms are microbial organizations that adhere to food processing surfaces, are resistant to disinfectants, deteriorate machinery and contaminate food. At the University of Zaragoza, this study was conducted to evaluate the *in vitro* elimination of biofilms formed by *Escherichia coli* MG1655 and *Listeria monocytogenes* EGD-e on polystyrene and stainless steel surfaces, by applying essential oils or their individual constituents: carvacrol, limonene oxide and orange oil in doses of 500 and 1000 ppm each, as well as the influence of pH (4.0 and 7.0). The formation of the biofilm was stimulated by cultures in plates of 24 stainless steel wells (AISI 304 and AISI 316) and polystyrene in static air stoves, for 72 hours at 37°C. The three natural compounds were then applied directly to the biofilms, showing different degree of effectiveness in reducing the number

of sessile cells of the two bacteria, thus carvacrol at doses of 1000 ppm, proved the most effective, with microbial inactivation levels greater than 5 logarithmic cycles on AISI 304 and AISI 316 stainless steel surfaces, without influence on the value of the pH evaluated. The study showed that stainless steel surfaces favor the antimicrobial action of carvacrol compared to polystyrene, which helps ratify the use of stainless steel as an ideal material for food contact process surfaces, as well as offering an organic alternative to disinfection in the food industry.

Keywords: food industry; stainless steel; biofilm; essential oil; carvacrol.

Resumo

Biofilmes são organizações microbianas que aderem às superfícies de processamento de alimentos, são resistentes a desinfetantes, deterioram as máquinas e contaminam os alimentos. Na Universidade de Zaragoza, este estudo foi realizado para avaliar a eliminação *in vitro* de biofilmes formados por *Escherichia coli* MG1655 e *Listeria monocytogenes* EGD-e em superfícies de poliestireno e aço inoxidável, por meio da aplicação de óleos essenciais ou seus constituintes individuais: carvacrol, óxido de limoneno e óleo de laranja nas doses de 500 e 1000 ppm cada, bem como a influência do pH (4,0 e 7,0). A formação do biofilme foi estimulada por meio de culturas em placas de 24 poços de aço inoxidável (AISI 304 e AISI 316) e de poliestireno em fornos de ar estático, por 72 horas a 37°C. Em seguida, os três compostos naturais foram aplicados diretamente nos biofilmes, apresentando um grau de eficácia diferente na redução do número de células sésseis das duas bactérias, sendo o carvacrol em doses de 1000 ppm o mais eficaz, com maiores níveis de inativação microbiana. em 5 ciclos logarítmicos em superfícies de aço inoxidável AISI 304 e AISI 316, sem influência do valor de pH avaliado. O estudo mostrou que as superfícies de aço inoxidável favorecem a ação antimicrobiana do carvacrol em relação ao poliestireno, o que contribui para ratificar a utilização do aço inoxidável como material ideal para superfícies de processos em contato com alimentos, além de oferecer uma alternativa orgânica para desinfecção em alimentos. Indústria.

Palavras-chave: Indústria de alimentos; aço inoxidável; biofilme; óleo essencial; carvacrol.

Introducción

La inocuidad, según la Real Academia de la Lengua Española, se define como el carácter de ser inocuo, es decir, que no cause daño al consumidor. En este sentido, la salud pública se pone en

riesgo cuando a lo largo de la cadena alimentaria no se siguen buenas prácticas de producción, procesamiento, conservación, transporte y/o venta de alimentos (Nguyen-Viet, Tuyet-Hanh, Unger, Dang-Xuan, & Grace, 2017). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015), la inocuidad de los alimentos es una cuestión prioritaria para los consumidores, productores y gobiernos, y señala que invertir en salubridad de los alimentos significa invertir en la próxima generación. Su importancia radica en que con frecuencia se producen brotes alimentarios vehiculizados por una amplia variedad de productos alimenticios (Jofré *et al.*, 2016). Estos brotes pueden estar causados por malas prácticas higiénicas a lo largo de la cadena de producción, desde las prácticas agrícolas y/o ganaderas hasta las ejercitadas por los consumidores. Además de suponer un riesgo para la salud del consumidor también tiene repercusión a nivel económico, con interrupción del comercio nacional e internacional, como lo demostró el grave brote con *Escherichia coli* O104:H4 en Alemania en 2011 (Asselt, Fels-Klerx, Breuer, & Helsloot, 2017). Entre las bacterias patógenas causantes de infecciones e intoxicaciones alimentarias destacan algunos serotipos de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* entérica Typhimurium y *Staphylococcus aureus* (Duvenage, Duvenage, Plessis, Volschenk, & Korsten, 2017). Según estudios actuales, es conocido que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente exclusivamente de forma libre, comportándose como seres unicelulares, sino que, en muchas ocasiones, pueden encontrarse formando parte de comunidades microbianas con un sistema de organización más típico de los organismos coloniales, creciendo adheridas a superficies y embebidas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan, a estas estructuras biológicas se las denomina biopelículas (Domínguez Rodríguez, Badiola Díez, Cepeda Sáez, Más Barón, & Rodríguez Ferri, 2010). Las biopelículas se reconocen como un ecosistema microbiano unido a una superficie abiótica y embebido dentro de sustancias poliméricas extracelulares sintetizadas por las propias células. La formación de biopelículas bacterianas es una cuestión alarmante en la industria alimentaria debido a su elevada resistencia frente a antimicrobianos, calor y desinfectantes (Branda, Kolter, Chu, Kearns, & Losick, 2006). Las biopelículas comparten una característica estructural importante; sus células constituyentes están unidas por una matriz extracelular que se compone principalmente de macromoléculas, incluyendo polisacáridos, proteínas, y ácidos nucleicos, que son producidas por las propias células. Además, se ha demostrado que la matriz extracelular

desempeña un papel esencial en el establecimiento y mantenimiento de la estructura de las biopelículas (Roux *et al.*, 2015).

Las bacterias más comunes en formación de biopelículas son *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Cronobacter sakazakii* (Bae, Baek, & Lee, 2012). Estas bacterias, poseen la capacidad de desarrollar biopelículas y adherirse en la mayoría de las superficies ampliamente utilizadas en el procesamiento de alimentos, incluyendo acero inoxidable, juntas de goma y polímeros, y suponer una fuente de contaminación cruzada para el alimento. Además, se ha evidenciado que las biopelículas desarrolladas en el procesado de alimentos de la industria poseen una mayor resistencia debido a la elevada cantidad de nutrientes disponibles, favoreciendo su crecimiento y diseminación a lo largo de la cadena productiva (Kim & Kang, 2017).

En cuanto a los materiales para el contacto con alimentos en la industria son el acero inoxidable, vidrio, caucho, policarbonato, poliuretano, poliestireno, polipropileno, teflón, nitrilo, titanio, aluminio, cerámica y madera. Es habitual que las biopelículas puedan desarrollarse en cualquiera de estas superficies. La adhesión al sustrato depende de las propiedades fisicoquímicas del sustrato tales como textura, hidrofobicidad y carga superficial (Pagán & García-Gonzalo, 2016). El principal factor que promueve el proceso de formación de biopelículas es el envejecimiento de los materiales de contacto, lo que habitualmente se produce por la temperatura, la utilización, los agentes de limpieza, etc. (Storgards, Simola, Sjöberg, & Wirtanen, 1999).

El acero inoxidable posee una alta resistencia a la corrosión debido a sus altos contenidos de cromo y níquel, sin embargo, en función de su composición, pueden presentar diferentes propiedades mecánicas y tribológicas (Biehler, Hoche, & Oechsner, 2017). AISI (American Iron and Steel Institute) 304 y AISI 316 son los aceros inoxidables más utilizados en la fabricación de equipos para la industria alimentaria. AISI 304 es un acero con un mínimo de 18% de cromo, 8% de níquel y hasta 0,08% de carbono, mientras que AISI 316, es un acero que tiene hasta 3% de molibdeno y más alto contenido de níquel (10-14%) que AISI 304. La principal diferencia entre los dos aceros, AISI 304 y AISI 316, es su contenido de molibdeno, añadido para aumentar la resistencia a la corrosión en diversos ambientes (salmueras, blanqueo, biofluidos, etc.); concretamente el molibdeno reduce e inhibe la corrosión por picadura inducida por cloruros. A pesar de que el acero inoxidable AISI 316 posee mayor resistencia química, el acero inoxidable AISI tipo 304 ha sido el

más ampliamente utilizado por los fabricantes de equipos para la industria alimenticia debido a su menor coste (Casarin, Casarin, Brandelli, *et al.*, 2016).

Para eliminar eficazmente los residuos que puedan contener microorganismos es fundamental la utilización de un método de limpieza eficaz. Entre los métodos de limpieza empleados, cabe destacar la aplicación de fuerzas físicas y/o productos químicos tales como agentes tensoactivos o productos alcalinos, utilizados para suspender y disolver residuos alimentarios por disminución de la tensión superficial. Entre los principales agentes antimicrobianos convencionales empleados en los sistemas de limpieza se encuentran el yodo, hipoclorito, ácido aniónico, ácido peroxiacético y amonio cuaternario. Así, los procesos de limpieza normalmente pueden llegar a eliminar el 90% o más de los microorganismos asociados a las superficies de contacto, pero no siempre resulta posible lograr su total eliminación. Si bien uno de los principales inconvenientes de una buena limpieza o desinfección es a menudo el coste que implica el tiempo de inactividad de los equipos, la razón fundamental que nos obliga a revisar los sistemas de limpieza actuales es el alto grado de contaminación y residuos que se genera por parte de los productos de limpieza empleados, lo que supone en ocasiones un grave riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Simões, Simões, & Vieira, 2010).

En la actualidad, como alternativa al uso de desinfectantes químicos tradicionales, se está estudiando la eficacia de antimicrobianos de origen natural. Esto responde a la demanda de los consumidores por productos alimenticios más seguros, naturales y saludables, y al reciente crecimiento negativo y percepción de los consumidores contra los productos químicos sintéticos, lo que se está desplazando el esfuerzo de investigación hacia alternativas naturales (Raffaella *et al.*, 2017). En este sentido, la investigación de nuevas sustancias en la desinfección capaces de evitar la formación de biopelículas o causar su destrucción es un área de creciente interés.

Según Botta and Scaffaro (2010), se está estudiando el uso de antimicrobianos naturales con el fin de reemplazar a los agentes de limpieza tradicionales, entre los que se destacan los aceites esenciales (AEs) de especias y hierbas aromáticas. Numerosos estudios han demostrado la eficacia de los componentes de los AEs en la eliminación de las biopelículas, pero hay que tener en cuenta que muy pocas veces se ha estudiado en profundidad en materiales comúnmente utilizados en la industria, como son los aceros (Dorman & Deans, 2000). Estos aceites esenciales (AEs) son comprobados antimicrobianos de origen vegetal, productos líquidos aromáticos que se extraen con

procesos como la destilación, la extrusión mecánica o la extracción con solventes volátiles (Burt, 2004). En la naturaleza, sirven de protección a las plantas que los sintetizan debido a sus propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas e insecticidas (Bakkali, Averbeck *et al.*, 2008). Sus propiedades antimicrobianas residen en la gran variedad de compuestos terpenoides que los componen, como por ejemplo el carvacrol, compuesto monoterpenoide fenólico del orégano. Este compuesto tiene un elevado efecto antimicrobiano ya que provoca daños estructurales y funcionales a la membrana celular, y la desintegración de la membrana externa causando la liberación de lipopolisacáridos (LPS) en bacterias Gram-negativas. Aunque el carvacrol afecta a la membrana externa, se considera que la principal causa de su efecto antimicrobiano reside en el daño producido en la membrana citoplasmática, de esta manera repercute en el transporte pasivo de iones a través de ella (Hyldgaard, Mygind, & Meyer, 2012).

Por otra parte, los aceites cítricos, y concretamente el obtenido de la naranja, se utilizan ampliamente en diversas aplicaciones en las industrias de los alimentos. Los aceites cítricos son mezclas de más de cien compuestos que se pueden clasificar en tres fracciones: hidrocarburos terpénicos, compuestos oxigenados y compuestos no volátiles. El óxido de limoneno se encuentra en muchos aceites esenciales de plantas y en especial de origen cítrico, como sucede en el aceite esencial de naranja. El óxido de limoneno es un terpeno producido a partir de la combinación de varias unidades de isopreno ($C_5 H_8$) sintetizados en el citoplasma de las células vegetales de la corteza de los cítricos (Caballero & Caballero, 2003). Los estudios realizados con óxido de limoneno han mostrado que su actividad antimicrobiana es moderada frente a 25 géneros diferentes de bacterias que plantean problemas en los animales, plantas y productos alimenticios (Dorman & Deans, 2000). Los aceites esenciales y sus principales constituyentes son generalmente reconocidos como seguros (GRAS) (Fisher, Phillips, & McWatt, 2009).

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo fue estudiar *In vitro* la influencia de la superficie de contacto, acero inoxidable (AISI 304 y AISI 316) y plástico de laboratorio (Poliestireno), en la eliminación de biopelículas formadas por *Escherichia coli* MG1655 y *Listeria monocytogenes* EGD-e mediante la aplicación de aceites esenciales o sus constituyentes individuales: carvacrol, óxido de limoneno y aceite de naranja, en concentraciones de 500 y 1000 ppm cada uno y bajo dos pH distintos: 7,0 y 4,0.

Materiales y métodos

Preparación de las biopelículas

Para llevar a cabo la formación de las biopelículas se emplearon dos cepas bacterianas diferentes: *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655. A partir de los crioviales, conservados a -80°C con glicerol, se realizaron siembras en estría en placas con TSA de forma semanal, para la obtención de colonias aisladas a partir de las cuales se realizarían los experimentos a largo del estudio. En primer lugar, se prepararon los precultivos microbianos; para ello, se inoculó una colonia, previamente aislada, en un tubo de ensayo con caldo de cultivo tripticasa de soja (TSB). Este tubo con TSB se incubó en agitación a 37°C durante 12 horas. A continuación, se inoculó, en una proporción 1:100, el precultivo en caldo de cultivo TSB estéril, previamente preparado. A continuación, se añadió 2 mL de la dilución en placas de microtitulación de 24 pocillos de plástico (Poliestireno) (control), y de acero inoxidable (AISI 304 y AISI 316). Estas placas se incubaron a 37°C durante 72 horas en una estufa de aire estático.

Recuento del número de microorganismos presentes en las biopelículas.

Tras las 72 horas se eliminó el sobrenadante de los pocillos y se procedió al lavado de la placa cuidadosamente con agua destilada, para eliminar los restos medio de cultivo. Una vez realizado el lavado, en cada pocillo de la placa se añadieron 1,5 ml de agua de peptona (0,1%) con Tween 80 (dilución 1:100), a los cuales se les aplicó ultrasonidos durante diez minutos para lograr la disgregación de la biopelícula formada en la placa. Posteriormente, se llevaron a cabo diluciones seriadas en agua de peptona (0,1%) y se procedió a la siembra de 100 μL en placas Petri por homogeneización en masa en medio de cultivo tripticasa de soja (TSA). Las placas inoculadas con *L. monocytogenes* EGD-e se incubaron durante 48 horas a 35°C , mientras que las de *E. coli* MG1655 se incubaron durante 24 horas a 35°C . Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de colonias mediante un contador automático de colonias.

Tratamiento de destrucción de las biopelículas con carvacrol, óxido de limoneno y aceite de naranja.

Para ejecutar los estudios de eliminación de biopelículas formadas por *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655, se realizó una revisión bibliográfica con el objetivo de seleccionar, de forma aproximada, las concentraciones de los antimicrobianos naturales para aplicar en los tratamientos de destrucción de las biopelículas, para así poder comparar con estudios previos los resultados

obtenidos. Las concentraciones seleccionadas para este estudio fueron de 500 y 1000 ppm para los tres compuestos naturales: carvacrol, óxido de limoneno y aceite de naranja, en base previos estudios (Fernandez, 2015; Alfonso, 2016). Así, tras el lavado, y de forma paralela al recuento de células en la biopelícula, se realizó el tratamiento de eliminación de las biopelículas con los diferentes compuestos individuales (CIs; carvacrol y óxido de limoneno) y el aceite esencial (AE) de naranja. Según Oussalah, Caillet, Saucier, & Lacroix (2007), el pH puede influir en la efectividad de los tratamientos, por ello se evaluaron dos valores: un neutro (7,0) y un ácido (4,0), añadiendo a cada uno de los pocillos, donde se encontraban las biopelículas, 2 mL de tampón McIlvaine a pH 4,0 y pH 7,0 con los CIs disueltos. Los CIs se aplicaron a una concentración de 500 ppm y 1000 ppm para evaluar su acción individual. Se dejó actuar al antimicrobiano, en contacto con la biopelícula, durante 60 minutos a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizó el lavado de los pocillos, para realizar el posterior recuento en placa con el fin de determinar la cantidad de microorganismos eliminados de la biopelícula.

Análisis estadístico de datos

Los datos para la cuantificación de las biopelículas se obtuvieron por triplicado en cada experimento, y en base a tres experimentos independientes. En las gráficas se muestran las medias y la desviación estándar (sd) de todas las réplicas.

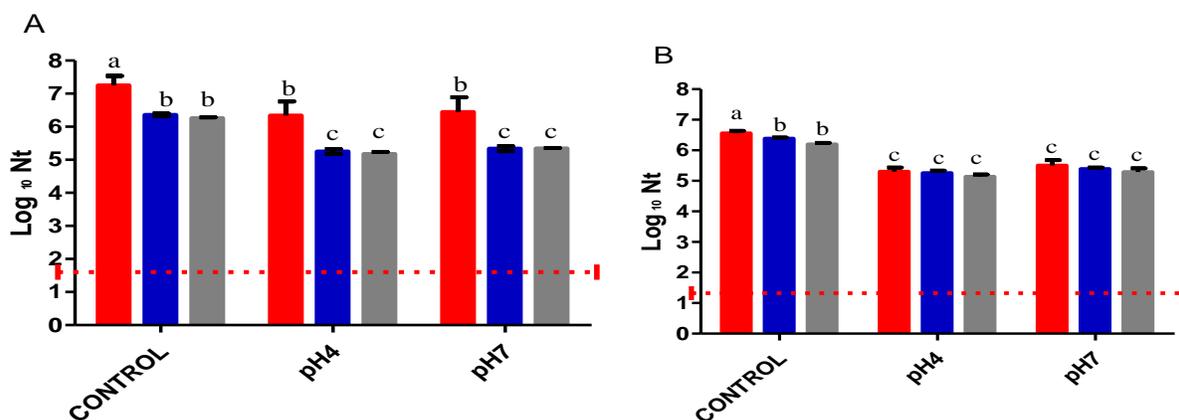
Por otro lado, se empleó el t-test o análisis ANOVA para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados. Complementariamente se realizó un post test Tukey, mediante la herramienta GraphPadPRISM®. La significancia estadística de cada uno de ellos se consideró a $p < 0,05$.

Resultados y discusión

En primer lugar, se determinó la concentración inicial de células sésiles de las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 tras 72 horas de incubación en una estufa de aire estático a 37°C en función del material de contacto (Figura 1). Como se observa en la figura 1A, el recuento inicial de las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e crecidas en poliestireno fue aproximadamente 1 ciclo logarítmico mayor ($>10^7$ UFC/mL) que el obtenido en cualquiera de los dos aceros empleados ($>10^6$ UFC/mL) ($p < 0,05$). Si bien las diferencias fueron mucho más reducidas, también las biopelículas de *E. coli* MG1655 (Figura 1B) alcanzaron mayores recuentos en poliestireno que en acero inoxidable ($p < 0,05$). Por otra parte, a modo de control, se verificó

que el tratamiento durante 60 minutos en ausencia de antimicrobianos, únicamente en presencia del tampón, y un posterior lavado, eliminaba menos de 2 ciclos logarítmicos de la población microbiana inicial, no existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tampón de pH 4,0 y el de pH 7,0 en ninguno de los materiales empleados. No obstante, a pesar de eliminar gran parte de la biopelícula inicial, esta seguía estando constituida por células viables, que podrían constituir una posible fuente de contaminación desde un punto de vista práctico, por lo que seguía siendo igualmente importante lograr un método efectivo que permitiera lograr el mayor grado de destrucción posible. Los resultados que se muestran en las figuras 2, 3 y 4 con objeto ilustran la reducción del número de células sésiles de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 tras la aplicación de carvacrol (Figura 2), óxido de limoneno (Figura 3) y aceite de naranja (Figura 4).

Figura 1: Recuentos microbianos (UFC/mL) de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) desarrolladas en placas microtiter de poliestireno (■), AISI 304 (■) y AISI 316 (■) tras incubación durante 72 h a 37°C (control), y tras posterior incubación a 37°C durante 60 min en presencia de tampón de pH 4,0 (pH 4) o pH 7,0 (pH 7). Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada, las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre materiales y sus respectivos pHs.

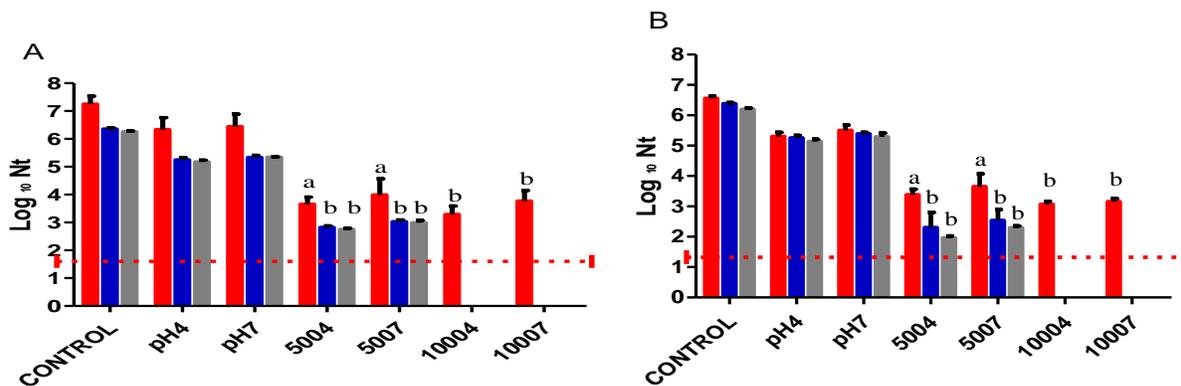


Carvacrol

El carvacrol posiblemente afecte al plegamiento de las proteínas de la membrana externa. Según Burt (2004), la presencia de una concentración sub-letal de carvacrol en el medio de crecimiento de *E. coli* provocó una alteración en el plegamiento de proteínas y la inhibición de la síntesis de flagelina, que causó el crecimiento de nuevas células sin flagelos. Además, las células que poseían

flagelos mostraron una disminución de la motilidad en presencia de carvacrol, lo que indica que este compuesto puede alterar el potencial de membrana, y de este modo, la fuerza motriz de protones necesaria para impulsar el movimiento flagelar y regular el transporte de nutrientes a través de las envolturas celulares. Como se observa en la figura 2, en el caso de *L. monocytogenes* EGD-e (Figura 2A) la aplicación de 500 ppm de carvacrol permitió reducir en aproximadamente 2 ciclos logarítmicos la población de células sésiles crecidas en los pocillos de poliestireno, y en aproximadamente 3 ciclos logarítmicos en los de AISI 304 y 316. Con lo que respecta a *E. coli* MG1655, tras la aplicación de 500 ppm de carvacrol se obtuvieron unos resultados similares en cuanto al nivel de inactivación en comparación con las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e, y si bien se alcanzó una destrucción de la biopelícula obtenida en AISI 316 sensiblemente mayor, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los dos tipos de acero inoxidable ensayados. Estos resultados corroboran los obtenidos en un estudio previo sobre *E. coli*, en el que se lograban también reducciones cercanas a los 3 ciclos logarítmicos tras 72 horas de incubación en poliestireno (Bazargani & Rohloff, 2016). Al realizar el análisis estadístico entre los materiales se observó que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el plástico y los dos aceros, pero no entre los propios aceros. Como se observa en la Figura 2, el tratamiento de 1000 ppm de carvacrol frente a las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y de *E. coli* MG1655 formados en pocillos de AISI 304 y 316, causaron una reducción microbiana de 5 ciclos logarítmicos, sin embargo los valores de inactivación en poliestireno fueron inferiores: 3 ciclos logarítmicos. En relación a los resultados obtenidos en poliestireno, estudios realizados también en este material obtuvieron resultados similares cuando trataron de destruir biopelículas de *E. coli* MG1655 mediante la adición de carvacrol a concentraciones de 700 ppm (Pérez-Conesa, Cao, Chen, McLandsborough & Weiss, 2011; Rigotti *et al.*, 2017). Por otra parte, estos resultados demuestran la importancia del material dónde se adhiere y desarrolla la biopelícula, en la efectividad de los tratamientos desinfectantes mediante carvacrol. Si bien los resultados obtenidos en poliestireno confirman resultados previos de nuestro grupo de investigación (Fernández, 2015), los obtenidos en acero muestran por primera vez que este material no solo dificulta la formación de biopelículas sino que además, facilita el ataque de este compuesto antimicrobiano. En este sentido, el estudio demuestra que las diferencias químicas entre los dos AISI empleados no interferirían en la resistencia de las biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 al carvacrol.

Figura 2: Recuentos microbianos (UFC/mL) de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) en placas microtiter de poliestireno (■), AISI 304 (■) y AISI 316 (■), tras incubación a 37°C durante 60 min en presencia de 500 ppm de carvacrol a pH 4 (5004) o pH7 (5007) o 1000 ppm de carvacrol a pH 4 (10004) o pH 7 (10007). Como control se incluyen los resultados recogidos en la Figura 1. Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada, las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre materiales y sus respectivos pHs.



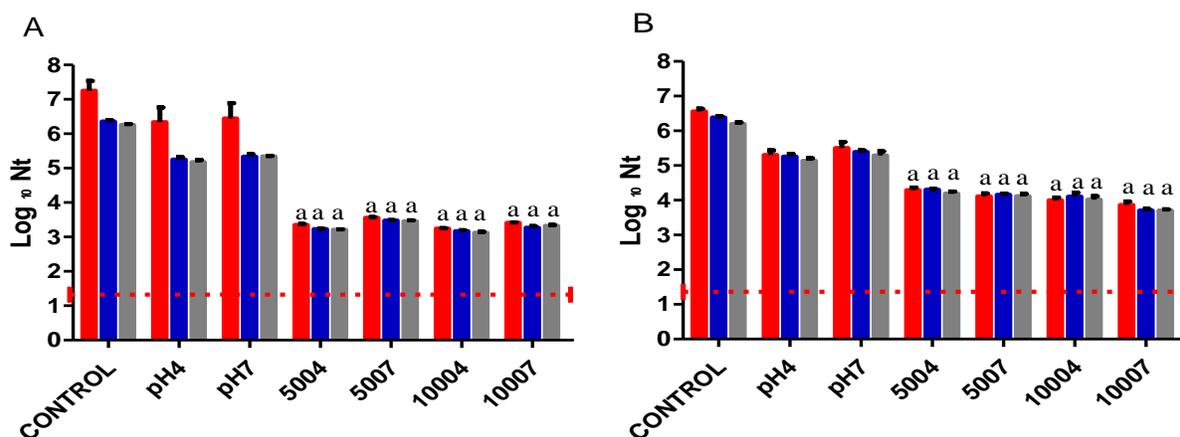
Óxido de limoneno

El tratamiento de óxido de limoneno frente a la biopelícula formada por *L. monocytogenes* EGD-e, a una concentración de 500 y 1000 ppm del compuesto, permitió reducir hasta 2 ciclos logarítmicos de la carga de células sésiles de las biopelículas, independientemente del tipo de material de contacto empleado y también del pH del medio de tratamiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en ningún caso. Los resultados obtenidos en poliestireno confirman resultados previos del grupo de investigación (Espina, Somolinos, Pagán, & García-Gonzalo, 2010).

En lo que respecta a *E. coli* MG1655, el tratamiento de óxido de limoneno tan solo logró una reducción microbiana de 1 ciclo logarítmico en ambos pHs, independientemente de la concentración utilizada, 500 o 1000 ppm, o del material de los pocillos, plástico o acero inoxidable ($p < 0,05$) (Figura 3). Si bien los resultados obtenidos en poliestireno confirman resultados previos de nuestro grupo de investigación (Fernández, 2015), los obtenidos en acero muestran por primera vez que este material se comportaría de modo similar al poliestireno, y que las diferencias químicas entre los dos AISI empleados no interferirían en la resistencia de las biopelículas de *Listeria*

monocytogenes EGD-e y *E. coli* MG1655 al óxido de limoneno, en contraposición a lo observado anteriormente cuando el ataque se realiza con carvacrol, y en el que las biopelículas formadas sobre acero son más sensibles que las crecidas sobre superficie de poliestireno.

Figura 3. Recuentos microbianos (UFC/mL) de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) en placas microtiter de poliestireno (■), AISI 304 (■) y AISI 316 (■), tras incubación a 37°C durante 60 min en presencia de 500 ppm de óxido de limoneno a pH 4 (5004) o pH7 (5007) o 1000 ppm de carvacrol a pH 4 (10004) o pH 7 (10007). Como control se incluyen los resultados recogidos en la Figura 1. Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada, las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre materiales y sus respectivos pHs.



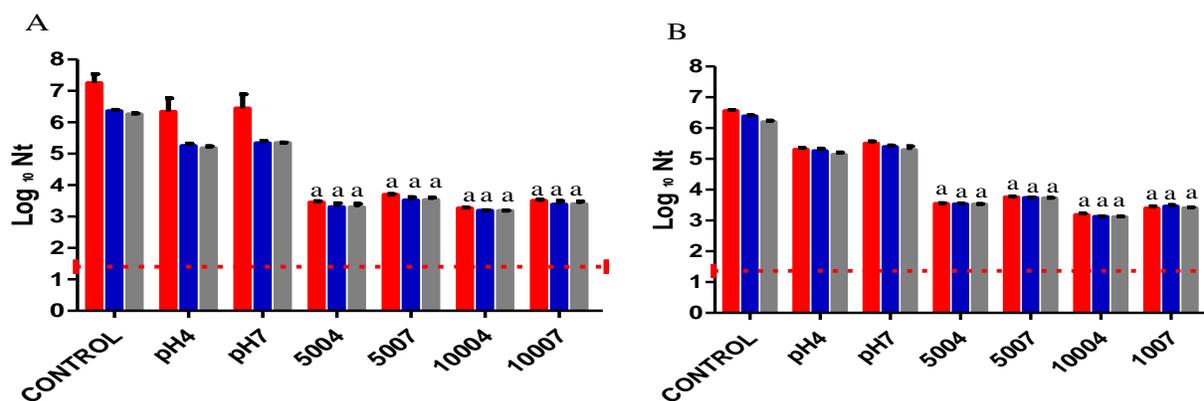
Aceite de naranja

Como muestra la figura 4, los resultados obtenidos con aceite de naranja son muy similares a los obtenidos con óxido de limoneno (Figura 6), es decir, se lograron alcanzar niveles moderados de destrucción de las biopelículas (no se alcanzan los 5 ciclos de inactivación deseados), independientemente del material empleado, la concentración de antimicrobiano y el pH del medio de tratamiento ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos sobre biopelículas crecidas en poliestireno confirman la escasa actividad antimicrobiana sobre biopelículas del aceite de naranja descrita previamente (Sandasi, Leonard, & Viljoen, 2008).

Así, se puede concluir que tanto el aceite de naranja como uno de sus principales constituyentes, el óxido de limoneno, logran niveles similares de inactivación microbiana, aunque insuficientes a

las concentraciones ensayadas, si lo que se pretende es alcanzar una destrucción superior a los 5 ciclos logarítmicos de las células sésiles. Para lograr ese nivel óptimo de destrucción, se hace preciso emplear carvacrol a la mayor concentración testada (1000 ppm), aunque solo sobre superficies de acero, que probablemente por su mayor porosidad, disminuyen la resistencia de las biopelículas frente a este agente antimicrobiano. Estos resultados confirmarían la idoneidad del acero inoxidable como material de contacto con alimentos de referencia para la industria alimentaria. Para la destrucción de biopelículas crecidas en poliestireno se requeriría o bien una mayor concentración de carvacrol, o el incremento de la temperatura de tratamiento hasta temperaturas moderadas de 45°C (Alfonso, 2016).

Figura 4: Recuentos microbianos (UFC/mL) de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) en placas microtiter de poliestireno (■), AISI 304 (■) y AISI 316 (■), tras incubación a 37°C durante 60 min en presencia de 500 ppm de aceite de naranja a pH 4 (5004) o pH7 (5007) o 1000 ppm de carvacrol a pH 4 (10004) o pH 7 (10007). Como control se incluyen los resultados recogidos en la Figura 1. Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada, las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre materiales y sus respectivos pHs.



Conclusiones

- Se demuestra que las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 desarrolladas sobre superficies de acero inoxidable no solo contienen un menor número

de células sésiles sino que además muestran una mayor sensibilidad al ataque de alguno de los antimicrobianos testados.

- Los tres compuestos naturales mostraron distinto grado de eficacia como agentes antimicrobianos con capacidad para reducir la presencia de células sésiles de biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655.
- A las concentraciones ensayadas (500 y 1000 ppm), los tratamientos con óxido de limoneno y aceite de naranja causaron una reducción insuficiente (≤ 5 ciclos logarítmicos) de las biopelículas, independiente del pH del medio de tratamiento y el material empleado como superficie de contacto.
- El carvacrol ha sido el agente antimicrobiano más eficaz frente a las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655, permitiendo alcanzar niveles de inactivación microbiana superiores a los 5 ciclos logarítmicos sobre biopelículas desarrolladas en superficies de acero inoxidable.
- Los tratamientos aplicados en medios ácidos y neutros revelaron que el pH del medio no ejerció efecto alguno sobre la eficacia de los antimicrobianos ensayados, en ninguna de las condiciones estudiadas (microorganismo diana, superficie de contacto, concentración o tipo de antimicrobiano).

Referencias

1. Alfonso, P. (2016). Efectos combinados del carvacrol y citral en la eliminación de biopelículas; Trabajo fin de master, Máster en Calidad Seguridad y Tecnología de los alimentos.
2. Arturo Rafael, C. H., Alejandro, V. G., & John Jairo, d. T. M. (2012). La etiqueta nutricional, política de seguridad alimentaria / Nutritional Labels, Food Security policy. Elsevier Science BV. 20(1), 168.
3. Asselt, E. D. v., Fels-Klerx, H. J. v. d., Breuer, O., & Helsloot, I. (2017). Food Safety Crisis Management—A Comparison between Germany and the Netherlands. *Journal of Food Science*, 82(2), 477-483. doi: 10.1111/1750-3841.13585

4. Augustin, M., Ali-Vehmas, T., & Atroshi, F. (2004). Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 7 (1): 55-64.
5. Bae, Y.-M., Baek, S.-Y., & Lee, S.-Y. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 465-473. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.017
6. Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164. doi:10.1016/j.foodcont.2015.09.036
7. Biehler, J., Hoche, H., & Oechsner, M. (2017). Corrosion properties of polished and shot-peened austenitic stainless steel 304L and 316L with and without plasma nitriding. *Surface and Coatings Technology*, 313, 40-46. doi:10.1016/j.surfcoat.2017.01.050
8. Botta, L., & Scaffaro, R. (2010). Control of biofilm formation by poly-ethylene-co-vinyl acetate films incorporating nisin. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 729-737.
9. Bouayad, L., & Hamdi, T.-M. (2012). Prevalence of *Listeria* spp. in ready to eat foods (RTE) from Algiers (Algeria). *Food Control*, 23(2), 397-399. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.08.006
10. Branda, S. S., Kolter, R., Chu, F., Kearns, D. B., & Losick, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1229-1238. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05020.
11. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
12. Caballero, B., & Caballero, B. (2003). *Encyclopedia of food sciences and nutrition: Volumes 1-10 (No. Ed. 2)*. Elsevier Science BV.
13. Casarin, L. S., Casarin, F. d. O., Brandelli, A., Novello, J., Ferreira, S. O., & Tondo, E. C. (2016). Influence of free energy on the attachment of *Salmonella Enteritidis* and *Listeria*

- monocytogenes on stainless steels AISI 304 and AISI 316. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 131-138. doi: 10.1016/j.lwt.2016.01.035
14. Casarin, L. S., Casarin, F. d. O., Soares, T. P., Aguzzoli, C., Figueroa, C. A., Soares, G. V., Tondo, E. C. (2016). Effect of Plasma Nitriding Surface Modification on the Adhesion of Food Pathogens to Stainless Steel AISI 316 and AISI 304. *Journal of Food Safety*, 36(3), 341-347. doi: 10.1111/jfs.12249
 15. Domínguez Rodríguez, L., Badiola Díez, J. J., Cepeda Sáez, A., Más Barón, A., & Rodríguez Ferri, E. F. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. Spain, Europe: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
 16. Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
 17. Duvenage, F. J., Duvenage, S., Plessis, E. M. D., Volschenk, Q., & Korsten, L. (2017). Viable bacterial population and persistence of foodborne pathogens on the pear carpoplane. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1185-1192. doi: 10.1002/jsfa.7847
 18. Espina, L., Somolinos, M., Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2010). Effect of citral on the thermal inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in citrate phosphate buffer and apple juice. *Journal of food protection*, 73(12), 2189-2196.
 19. Fernández, A. (2015). Eliminación de biopelículas microbianas mediante el uso de compuestos antimicrobianos de origen natural; Trabajo fin de master, Master en Calidad Seguridad y Tecnología de los alimentos.
 20. Fisher, K., Phillips, C., & McWatt, L. (2009) The use of an antimicrobial citrus vapour to reduce *Enterococcus* sp. on salad products. *International Journal of Food science & technology*, 44(9), 1748-1754.
 21. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012
 22. Jofré, A., Garriga, M., Aymerich, T., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., & Bover-Cid, S. (2016). Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria*

- monocytogenes in ready-to-eat (RTE) foods: activity 1, an extensive literature search and study selection with data extraction on *L. monocytogenes* in a wide range of RTE food. EFSA Supporting Publications, 13(12), 1141E-n/a. doi: 10.2903/sp.efsa.2016.EN-1141
23. Kim, S.-S., & Kang, D.-H. (2017). Combination treatment of ohmic heating with various essential oil components for inactivation of food-borne pathogens in buffered peptone water and salsa. *Food Control*, 80, 29-36. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.04.001
 24. López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 2(7), a000398. doi:10.1101/cshperspect.a000398
 25. Nguyen-Viet, H., Tuyet-Hanh, T. T., Unger, F., Dang-Xuan, S., & Grace, D. (2017). Food safety in Vietnam: where we are at and what we can learn from international experiences. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1), 39. doi: 10.1186/s40249-017-0249-7
 26. OMS. (2015). World health day 2015. Food Safety.
 27. O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
 28. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 414-420. doi:10.1016/j.foodcont.2005.11.009
 29. Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2016). Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: a review. *Journal of Postdoctoral Research* (No. ART-2015-95845).
 30. Pérez-Conesa, D., Cao, J., Chen, L., McLandsborough, L., & Weiss, J. (2011). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. *Journal of Food Protection®*, 74(1), 55-62
 31. Pesci, E. C., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11229-11234.
 32. Pimentel-Filho, N. d. J., Martins, M. C. d. F., Nogueira, G. B., Mantovani, H. C., & Vanetti, M. C. D. (2014). Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion

- to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.004
33. Puga, C. H., SanJose, C., & Orgaz, B. (2016). Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan. *Food Control*, 65, 143-151. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.01.012
34. Raffaella, C., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., & Baffone, W. (2017). Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 132-140. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.021
35. Real Academia Española. (2014). *Diccionario de la Lengua Española* (23.a ed.). Madrid, España
36. Rigotti, R. T., Corrêa, J. A. F., Maia, N. J. L., Cesaro, G., Rosa, E. A. R., Macedo, R. E. F. d., & Luciano, F. B. (2017). Combination of natural antimicrobials and sodium dodecyl sulfate for disruption of biofilms formed by contaminant bacteria isolated from sugarcane mills. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 26-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.01.007>
37. Roux, D., Cywes-Bentley, C., Zhang, Y. F., Pons, S., Konkol, M., Kearns, D. B., Pier, G. B. (2015). Identification of poly-N-acetylglucosamine as a major polysaccharide component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix *Journal of Biological Chemistry*, 290(31), 19261-19272
38. Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407-413. doi: 10.1016/j.tifs.2009.01.054
39. Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573-583. doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008
40. Storgards, E., Simola, H., Sjöberg, A. M., & Wirtanen, G. (1999). Hygiene of Gasket Materials Used in Food Processing Equipment Part 1. *Food and Bioproducts Processing*, 77(2), 137-145. doi: 10.1205/096030899532286

41. Trentin, D. S., Bonatto, F., Zimmer, K. R., Ribeiro, V. B., Antunes, A. L. S., Barth, A. L., Macedo, A. J. (2014). N₂/H₂ plasma surface modifications of polystyrene inhibit the adhesion of multidrug resistant bacteria. *Surface and Coatings Technology*, 245, 84-91. doi: 10.1016/j.surfcoat.2014.02.046
42. Wirtanen, G., Husmark, U., & Mattila-Sandholm, T. (1996). Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protection*®, 59(7), 727-733.

©2020 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons

Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)

(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).