

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE
BACTERIÓFAGOS SOBRE BIOFILMS
MIXTOS**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

CASANDRA SALDAÑA LUCIO

JULIO, 2015



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una forma u otra, han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar quiero agradecer la dedicación de mis tutoras, la Dra. Ana Rodríguez González y la Dra. Pilar García Suárez, gracias por ser mis guías durante la realización de este Proyecto. Estoy orgullosa de haber contado con ellas en esta etapa.

En especial a Silvia González y Lucía Fernández, mis compañeras de laboratorio, por el trato recibido desde el primer día, por los conocimientos transmitidos y su gran ayuda, sin la cual, este trabajo no habría tomado forma. También hago extensible este agradecimiento a Eva, M^a Jesús y demás personal del IPLA.

A mis compañeros del máster, por hacer este año mucho más ameno y que el estudio fuera más llevadero. Ha sido un placer haberles conocido.

A todos los profesores que han impartido clases en este máster, por su dedicación y por las enseñanzas aportadas.

A Carlos y a mis amigas, por los ánimos recibidos y por saber escucharme cuando lo he necesitado.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres y a mi hermana, el respaldo que he sentido, la comprensión y el apoyo constante e incondicional para seguir adelante, no solo en la realización de este trabajo y del máster, sino en todas las etapas de mi vida. Y en especial mi más sincero agradecimiento a mi madre, sin su ayuda hubiera sido imposible llegar hasta aquí, gracias por su paciencia, por sus sabias palabras y sobre todo gracias por estar siempre al pie del cañón.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES	6
2.1. El género <i>Staphylococcus</i>	6
2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.1.2. Importancia de <i>S. aureus</i> en salud pública.....	7
2.1.3. <i>S. aureus</i> y los alimentos	10
2.2. El género <i>Lactobacillus</i>	12
2.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	13
2.3. Biofilms.....	14
2.3.1. Estructura de un biofilm.....	16
2.3.2. Fases del desarrollo de un biofilm	17
2.3.3. Capacidad de <i>S. aureus</i> de formar biofilms.....	19
2.4. Bacteriófagos.....	22
2.4.1. Características generales.....	22
2.4.2. Ciclo biológico	25
2.4.3. Ventajas e inconvenientes de utilizar bacteriófagos en la industria alimentaria.....	27
2.4.4. Susceptibilidad de los biofilms a los bacteriófagos.....	28
3. MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	31
3.2. Cálculo del número de células en los cultivos de 18 h (una noche, o/n)	32
3.3. Curvas de crecimiento.....	33
3.4. Formación de biofilms monoespecie y mixtos.....	34
3.4.1. Determinación de la biomasa de un biofilm	34
3.4.2. Cálculo del número de células viables en los biofilms formados.....	35
3.5. Propagación del bacteriófago ϕ IPLA-RODI en medio sólido.....	36
3.5.1. Cálculo del título de una suspensión fágica	37
3.6. Determinación de la sensibilidad/resistencia a fagos en medio sólido.....	37

3.6.1.	Test del “spot o gota”	37
3.6.2.	Cálculo de la multiplicidad de infección (MOI)	38
3.7.	Tratamiento de biofilms de <i>S. aureus</i> y <i>L. plantarum</i> con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI	38
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1.	Determinación de la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> y <i>L. plantarum</i> en medio líquido.....	42
4.2.	Estudio de los biofilms formados con <i>S. aureus</i> y <i>L. plantarum</i>	45
4.2.1.	Determinación del número de bacterias de los cultivos de 18 h.....	45
4.2.2.	Evolución en la biomasa total de biofilms monoespecie y mixtos de <i>S. aureus</i> y <i>L. plantarum</i>	46
4.2.3.	Cuantificación de células viables por pocillo.....	47
4.3.	El bacteriófago ϕ IPLA-RODI	48
4.3.1.	Tratamiento de cultivos planctónicos de <i>S. aureus</i> con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI	49
4.4.	Tratamiento de biofilms de <i>S. aureus</i> y <i>L. plantarum</i> con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI	51
4.4.1.	Evaluación de la eficacia del bacteriófago mediante cuantificación de la biomasa total	51
4.4.2.	Evaluación de la eficacia del bacteriófago mediante la técnica del recuento de viables	52
4.5.	Alternativa al tratamiento de biofilms de <i>S. aureus</i> y <i>L. plantarum</i> con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI.....	53
5.	CONCLUSIONES	57
6.	ABREVIATURAS.....	59
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	62

Resumen

Abstract

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo fundamental poner de manifiesto la eficacia del bacteriófago lítico ϕ IPLA-RODI frente a células de *Staphylococcus aureus* cuando forman parte de biofilms mixtos. Para ello fue necesario desarrollar un modelo de laboratorio de formación de biofilms mixtos constituidos por *S. aureus* y *Lactobacillus plantarum*.

Los resultados obtenidos muestran la capacidad de *S. aureus* y *L. plantarum* de formar biofilms (monoespecies y mixtos) en las condiciones óptimas determinadas para un ambiente de laboratorio.

Por otra parte, el tratamiento de los biofilms con ϕ IPLA-RODI da lugar a una disminución, e incluso eliminación, del número de bacterias viables respecto al tratamiento establecido como control (ausencia de fagos). En particular, con una MOI de 1.000 y en las condiciones fijadas como óptimas en el experimento, la inhibición de *S. aureus* es total. A la vista de estos resultados se puede concluir que el uso del bacteriófago ϕ IPLA-RODI como estrategia de biocontrol de biofilms mixtos constituidos por *S. aureus* y *L. plantarum* desarrollados en las superficies, maquinaria y utensilios de la industria alimentaria puede ser un método efectivo para evitar o reducir la contaminación de los alimentos por *S. aureus*, incluso cuando forma parte de biofilms mixtos, lo que generaría una reducción de las intoxicaciones estafilocócicas y una reducción de las pérdidas económicas para las empresas.

ABSTRACT

The aim of this work is to demonstrate the effectiveness of lytic bacteriophage ϕ IPLA-RODI against *Staphylococcus aureus* cells as part of mixed biofilms. It was necessary to develop a laboratory model of mixed biofilms formation for *S. aureus* and *Lactobacillus plantarum*.

The results show the ability of *L. plantarum* and *S. aureus* to form biofilms (single and mixed) in the optimal conditions determined for a laboratory environment.

Moreover, treatment of biofilms with ϕ IPLA-RODI results in a reduction, or elimination, in viable bacteria compared with the established control treatment (no phage added). In particular, at MOI of 1000 and the optimal conditions set in the experiment, a total *S. aureus* inhibition was observed. In view of these results, it can be concluded that the use of bacteriophage ϕ IPLA-RODI as biocontrol strategy of mixed biofilms formed by *S. aureus* and *L. plantarum* developed on surfaces, equipment and utensils from the food industry can be an effective method to prevent or reduce food contamination by *S. aureus*, even when takes part of mixed biofilms, generating a reduction of staphylococcal poisoning and economic losses for food companies.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía (SEM) de <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Figura 2. Árbol filogenético de las bacterias lácticas y otras bacterias Gram +	12
Figura 3. Micrografía (SEM) de <i>L. plantarum</i>	13
Figura 4. Fases del desarrollo de un biofilm	17
Figura 5. Biofilm formado por células estafilocócicas unidas por una matriz polisacárida visualizado mediante SEM.....	18
Figura 6. Micrografía (LTSEM) de un biofilm de 24 h formado por <i>S. aureus</i>	19
Figura 7. Micrografías (SEM) de células de <i>S. aureus</i> adheridas sobre superficies de vidrio (A) y sobre acero inoxidable (B)	21
Figura 8. Micrografías (SEM) de la adherencia a superficies hidrofílicas, hidrofóbicas y superhidrofobas de <i>S. aureus</i> después de 2 y 4 horas.....	22
Figura 9. Representación esquemática de un bacteriófago	23
Figura 10. Clasificación de los bacteriófagos según su morfología y ácido nucleico... 24	
Figura 11. Representación esquemática de las diferentes etapas de los ciclos de vida de un bacteriófago	26
Figura 12. Fases del ciclo lítico de los bacteriófagos.....	26
Figura 13. Siembra por estría en placas Petri	32
Figura 14. Colonias aisladas de <i>S. aureus</i> s en medio BP de <i>L. plantarum</i> s en medio MRS-agar (siembra por estría).	32
Figura 15. Diluciones seriadas en tubos Eppendorf y siembra en placa BP con asa de Digralsky.	33
Figura 16. Lavado de las células adheridas con PBS.	35
Figura 17. Recogida de las células adheridas con hisopos estériles.....	35
Figura 18. Ensayo de crecimiento en TSB+0,25% glucosa de las bacterias <i>S. aureus</i> y <i>L. plantarum</i> a 32°C. Ambas bacterias se crecieron individualmente y combinadas.....	42
Figura 19. Curva de crecimiento de las especies bacterianas (SA: <i>S. aureus</i> y LP: <i>L. plantarum</i>) en cultivo líquido.....	43
Figura 20. Biomasa total determinada mediante tinción con cristal violeta en biofilms monoespecie y mixtos de <i>S. aureus</i> (SA) y <i>L. plantarum</i> (LP) incubados a 32°C durante 3, 5, 8 y 24 horas	46
Figura 21. Desarrollo de biofilms mono-especie y mixtos de <i>S. aureus</i> (SA) y <i>L. plantarum</i> (LP) en el que se representa el número de células adheridas por pocillo	47

Figura 22. Bacteriófago ϕ IPLA-RODI	49
Figura 23. Evolución del crecimiento (inóculo diluido 1:100) de <i>S. aureus</i> RNA 450 (SA) y <i>S. aureus</i> IPLA-16 (IPLA16) infectados con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOIs 1, 10 y 100).	50
Figura 24. Evolución del crecimiento (inóculo diluido 1:1000) de <i>S. aureus</i> RNA 450 (SA) y <i>S. aureus</i> IPLA-16 (IPLA 16) infectados con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOIs 1, 10 y 100)	50
Figura 25. Biomasa total de biofilms preformados de 5 h y tratados con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOI 10 y 100) durante 4 horas.	52
Figura 26. Evolución de células viables adheridas tras el tratamiento con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOI 10 y 100) sobre biofilms preformados de 5 h	53
Figura 27. Biomasa total de biofilms de 5 horas tratados con ϕ IPLA-RODI (MOI 1.000) a 32°C.durante 4 horas	54
Figura 28. Evolución de células viables adheridas tras el tratamiento con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOI de 1.000) sobre biofilms.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	9
Tabla 2. Microbiota que coexiste con <i>S. aureus</i> en las superficies de la industria alimentaria	20
Tabla 3. Crecimiento de <i>L. plantarum</i> y <i>S. aureus</i> en distintos medios de cultivo y a distintas temperaturas	41
Tabla 4. Parámetros de crecimiento de las cepas <i>S. aureus</i> y <i>L. plantarum</i> en medio TSB+0.25% glucosa incubados a 32°C durante 6 h.	44

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Introducción y objetivos

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La contaminación bacteriana representa la mayor preocupación en la industria alimentaria debido a sus graves consecuencias, tanto económicas como para la salud pública, debido a que provoca la mayoría de brotes de origen alimentario (toxiinfecciones).

Un buen diseño higiénico y un mantenimiento adecuado son factores cruciales para evitar la contaminación de los equipos utilizados para el procesado de los alimentos (Reij y Den Aantrekker, 2004). Sin embargo, aun controlando esto, pueden existir microorganismos resistentes, los cuales se describen como una especie o cepa que tiene más capacidad para sobrevivir a repetidas operaciones de limpieza y desinfección provocando que los alimentos pierdan su inocuidad durante los procesos de obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento, etc..

Cada tipo de microorganismo (bacterias, hongos, virus, protozoos) presenta diferentes respuestas frente a los antisépticos y desinfectantes, debido a sus diferencias en estructura celular, composición y fisiología (McDonnell y Rusell, 1999). La industria alimentaria reconoce que algunas especies son más resistentes a los biocidas que otras por ejemplo, las *pseudomonadáceas* y ciertas especies de estafilococos (Holah y col., 2002).

En este contexto, cabe destacar a *Staphylococcus aureus* ya que es uno de los principales agentes bacterianos causante de enfermedades transmitidas por los alimentos en los seres humanos por su capacidad para provocar intoxicaciones alimentarias. Esta enfermedad transmitida por alimentos es una de las más frecuentes en el mundo. En el boletín epidemiológico semanal (07.07 al 03.08 de 2014), publicado por el Instituto de Salud Carlos III (España), se informó de 2.342 brotes de transmisión alimentaria con 30.219 casos, 1.763 hospitalizaciones y 24 defunciones. El informe señala a *Salmonella enteritidis* como el agente causal predominante en los brotes ocasionados por bacterias, seguido por *S. aureus* (ISCIII, 2014).

La intoxicación alimentaria provocada por *S. aureus* es debida a la capacidad que tiene esta bacteria de producir enterotoxinas, denominadas “enterotoxinas estafilocócicas” (SE) que son extremadamente termorresistentes.

Introducción y objetivos

Las intoxicaciones alimentarias estafilocócicas tienen lugar generalmente por unas malas prácticas de higiene. Además, una mala refrigeración (ruptura de la cadena de frío) y conservación, hacen que *S. aureus* prolifere, con la consiguiente producción de enterotoxina.

Otra característica importante de *S. aureus* es su capacidad de formar biofilms sobre distintos tipos de superficies, lo que dificulta la eliminación de dicha bacteria durante los procesos de lavado y desinfección. Cabe señalar que la formación de biofilms es la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza, y se definen como comunidades bacterianas que permanecen adheridas a una superficie (biótica o abiótica), unidas entre sí por una matriz extracelular formada por polisacáridos, proteínas, ADN extracelular y ácidos teicoicos (Nikolaev y Plakunov, 2007). De hecho, *S. aureus* es capaz de coexistir con diversas especies bacterianas, algunas de las cuales están involucradas en el deterioro de los alimentos o son causa de preocupación para la seguridad alimentaria. En un estudio realizado por Gutiérrez y col. (2012), se determinó que la especie bacteriana más frecuente en las muestras examinadas y que coexistía perfectamente con *S. aureus* en los biofilms era *Lactobacillus plantarum*.

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilms en diferentes superficies de conducciones, equipos y materiales, lo que tiene repercusiones significativamente negativas, ya que estos biofilms pueden comportarse como reservorio del microorganismo produciendo contaminación cruzada de los alimentos, que actuarían como vectores para la transmisión de la enfermedad, causando brotes epidémicos, además de cuantiosas pérdidas económicas.

La contaminación de los equipos puede ocurrir durante la producción, cuando el paso de material alimenticio sobre una superficie deja residuos que favorecen el desarrollo de los microorganismos, que con el tiempo pueden alcanzar una cantidad suficiente para afectar la seguridad y la calidad del alimento (Lelieved y col., 2003, Vasconcellos, 2004). Esta situación representa un riesgo, debido a que pueden actuar como fuente potencial de transmisión de patógenos (Oliveira y col., 2007). Asimismo, es importante destacar que las superficies que no están en contacto directo con el alimento, como los suelos, las paredes, techos, vigas y estructuras de apoyo, también se

Introducción y objetivos

pueden comportar como reservorios potenciales de contaminación microbiana y representar un riesgo en la transmisión de patógenos (Mostert y col., 2005).

Desde los biofilms, los microorganismos pueden llegar a los alimentos de forma continuada en el tiempo, por contacto y contaminación cruzada, constituyendo un factor de aumento de riesgo frente a los patógenos. Cuando el biofilm transfiere además microorganismos alterantes, la durabilidad y aceptabilidad del producto se ven disminuidas o queda afectado de forma continuada si no se consigue eliminar el biofilm de las superficies de contacto.

Así, la principal consecuencia es la pérdida de seguridad en los productos. Un brote o una alerta alimentaria obliga a retirar y, probablemente, destruir el lote o lotes implicados y a paralizar la producción hasta que se verifique que las instalaciones y equipos están bajo control, lo que supone grandes pérdidas económicas para las empresas.

Entre las técnicas y estrategias que se pueden combinar para el control y eliminación de biofilms en una planta industrial figuran: el uso de superficies de contacto con propiedades antimicrobianas permanentes, los métodos de detección de materia orgánica o de microorganismos sobre superficies por bioluminiscencia, los sensores de superficie y de microscopía de epifluorescencia, los sistemas enzimáticos para la eliminación de biofilms, los desinfectantes, y una estrategia más reciente basada en el control de patógenos mediante bacteriófagos específicos.

En este contexto, cabe señalar que los bacteriófagos son competidores naturales de las bacterias, no alteran las cualidades nutricionales ni organolépticas de los productos alimenticios ni suponen ningún riesgo para la salud humana (Carlton y col., 2005). Por lo tanto, su utilización en sistemas de desinfección podría ser considerada positivamente por el creciente grupo de consumidores que demandan alimentos frescos o mínimamente procesados, y que rechazan los aditivos químicos. Para satisfacer estas exigencias, es lógico que las industrias alimentarias busquen nuevos métodos de conservación. Esto ha impulsado el estudio de nuevos mecanismos que inhiban el crecimiento microbiano por parte de los departamentos de I+D de las empresas y de los centros de investigación.

Introducción y objetivos

El uso de los bacteriófagos puede reducir, o incluso eliminar, el número de microorganismos patógenos en distintos puntos de la cadena alimentaria (materia prima, superficies de trabajo, maquinaria...). De hecho, ya existen productos comerciales basados en bacteriófagos, como por ejemplo Listex P100, Salmonalex y Listshield, reconocidos como sustancias GRAS (Generally Recognized as Safe) por la Food and Drug Administration (FDA) y el US Department of Agriculture (USDA) que están siendo utilizados por la industria alimentaria en algunos países (EEUU, Australia y Nueva Zelanda).

El presente estudio tiene como objetivo general la evaluación de la eficacia de los bacteriófagos para la eliminación de biofilms de *S. aureus*, para así evitar las implicaciones que este patógeno tiene en la salud humana y las repercusiones económicas que genera en la industria alimentaria. En última instancia, el fin de este estudio es determinar si el tratamiento con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI de los biofilms de *S. aureus* y *L. plantarum* desarrollados sobre una superficie de poliestireno podría utilizarse como un método de control de la contaminación a nivel industrial, lo que implicaría una mejora en los sistemas de limpieza y desinfección habitualmente utilizados, y así cabría esperar una reducción en la incidencia de la intoxicación estafilocócica.

Con estas premisas, el presente trabajo abordará los siguientes objetivos específicos:

- Estudio del modelo de desarrollo de biofilms monoespecie y mixtos de las bacterias *S. aureus* y *L. plantarum* en condiciones de laboratorio.
- Evaluación de la eficacia lítica del bacteriófago ϕ IPLA-RODI sobre biofilms monoespecie y mixtos formados por *S. aureus* y *L. plantarum*.

**CONSIDERACIONES
TEÓRICAS Y
EXPERIMENTALES**

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1. El género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*. Se reconocen 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos. Especialmente *S. aureus* y *S. epidermidis* han sido descritas como bacterias patógenas con importancia clínica (Cervantes, 2014). En 1883, Ogston introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego *staphyle*, que significa racimo de uvas.

Este género está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm (Figura 1), que pueden aparecer como células únicas, o bien agrupados en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos.

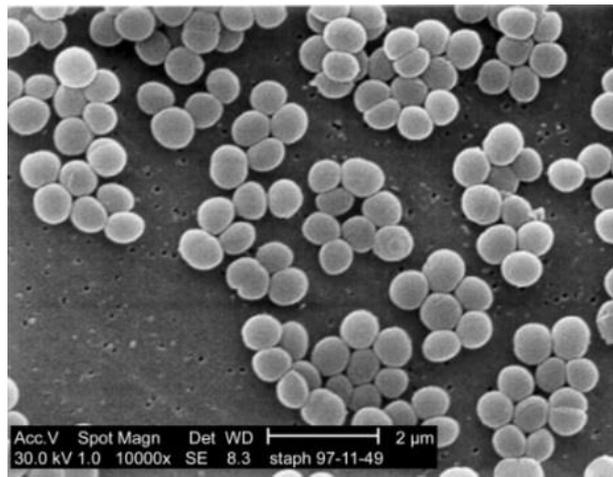


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de *Staphylococcus aureus*
([http://www.quickwiki.com/gl/Coco_\(bacteria\)](http://www.quickwiki.com/gl/Coco_(bacteria)))

Son bacterias no móviles, no esporuladas, anaerobias facultativas y mesófilas, que crecen en un rango de temperatura de 20°C a 45°C. En general no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo. Las bacterias del género *Staphylococcus* son catalasa positivas, característica que se utiliza para diferenciarlas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos (Cervantes, 2014).

2.1.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus posee todas las características del género *Staphylococcus*. Además, esta bacteria se caracteriza porque es capaz de producir coagulasa, un enzima extracelular que coagula el plasma y que permite diferenciar a *S. aureus* del resto de especies de estafilococos que son coagulasa negativos (Gutiérrez, 2012).

Este microorganismo es capaz de llevar a cabo la fermentación de la glucosa y el manitol con producción de ácido. En cuanto al pH, se desarrolla entre pH 4,0 y pH 9,8, con el óptimo en torno a la neutralidad. Tiene capacidad para crecer en alimentos con muy baja actividad de agua, desde 0,99 hasta 0,83, con el óptimo en 0,94 (Caso, 2015).

Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas.

El hábitat primario de *S. aureus* son los animales de sangre caliente, incluyendo el hombre. En la especie humana, *S. aureus* forma parte de la microbiota normal de la mucosa naso-faríngea (especialmente de las fosas nasales) y también de la piel (sobre todo en zonas pilosas como el cabello, o el periné). La tasa de portadores sanos de *S. aureus* se estima alrededor de un 20% de la población adulta, y puede ser de forma permanente o transitoria. De esta manera, los manipuladores asintomáticos pueden contaminar el producto durante la manipulación (al toser, estornudar o simplemente hablar) o por contacto directo del alimento con la piel (Caso, 2015).

2.1.2. Importancia de *S. aureus* en salud pública

La elevada virulencia de *S. aureus* fue notificada por primera vez en un estudio publicado en 1941, en donde se identificó 82% de mortalidad asociada a pacientes con bacteremias ocasionadas por este microorganismo en un hospital de la ciudad de Boston (Skinner y Keefer, 1941).

La introducción de la penicilina a principios de los años 40, para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus*, combatió eficazmente las infecciones ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, en 1946, en Inglaterra se observó que aproximadamente un 60% de los aislamientos de estafilococos eran resistentes a la

penicilina, y a mediados de 1950, los aislamientos de *S. aureus* mostraron niveles de resistencia aún más elevados. Los primeros aislamientos clínicos de *S. aureus* multiresistentes fueron detectados en 1957, y a principios de 1960 los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles (Velázquez-Meza, 2005).

Además, *S. aureus* es un patógeno oportunista, que afecta a sectores específicos de la población especialmente susceptibles con el sistema inmunitario débil (bebés y niños menores de 5 años, personas mayores de 60 años, enfermos de cáncer, diabéticos, portadores del VIH, pacientes tratados con corticosteroides y otros grupos de riesgo) en los que puede desencadenar problemas graves de salud como deshidratación, dolor de cabeza, calambres musculares, alteración de la presión sanguínea y coronaria (Elika, 2013).

S. aureus destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. Es una bacteria que posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades: produce lesiones superficiales de la piel, causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis, es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. También *S. aureus* es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada; y además, causa septicemia, impétigo y fiebres.

S. aureus posee diferentes factores de virulencia que están involucrados en distintos procesos (Bustos y col., 2006) (Tabla 1):

- Adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa.
- Evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares.
- Invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ .

Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglucano	Catalasa	Toxina α (Hemolisina α)
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina β
Factores de adhesión	Lipasas	Hemolisina γ
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Hemolisina δ
Polisacáridos capsulares	Nucleasas	Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL)
	Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas (SE)
	Estafilocinasa	Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)
	Colagenasa	Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *S. aureus* (Bustos y col., 2006).

S. aureus produce toxinas de acción general (Seija, 2008) que se indican a continuación:

- Hemolíticas:
 - α hemolisina o α toxina: tiene efecto letal sobre una variedad de membranas celulares eucariotas, incluyendo la de leucocitos polimorfonucleares humanos, así como también la de eritrocitos de diferentes especies animales.
 - β hemolisina: es una esfingomielinasa que actúa sobre diferentes células: leucocitos, eritrocitos, fibroblastos.
 - γ y δ hemolisinas: se encuentran en algunas cepas de *S. aureus* y lisan una variedad de células diferentes.
- Leucocidina: toxina con efecto tóxico directo sobre las membranas de los leucocitos polimorfonucleares humanos, causando degranulación del citoplasma, hinchamiento de células y lisis.

- Exfoliatinas o toxinas epidermolíticas: actividad proteolítica, actúan como superantígenos y disuelven la matriz mucopolisacárida de la epidermis. Son responsables del síndrome de piel escaldada.
 - o Exfoliatina A: producto de genes cromosómicos, termoestable e inactivada por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
 - o Exfoliatina B: origen plasmídico, inactivada por el calor y estable frente al EDTA.
- Toxina del shock tóxico (TSST-1): Denominada enterotoxina F. Implicada en la patogenia del síndrome del shock tóxico.
- Enterotoxinas estafilocócicas (SE): moléculas termoestables responsables de la intoxicación alimentaria producida por algunas cepas de *S. aureus*

2.1.3. *S. aureus* y los alimentos

S. aureus es uno de los principales agentes bacterianos causante de enfermedades transmitidas por los alimentos en los seres humanos porque puede causar intoxicación alimentaria. En los últimos años se ha detectado en los siguientes alimentos: leche cruda de vaca, cabra u oveja y queso elaborado con ella; seguido de carne cruda y productos cárnicos (salami, etc.); huevos y productos derivados (bollería, cremas, salsas); y en general, en todos aquellos alimentos preparados y consumidos en crudo que permanezcan refrigerados durante largos periodos de tiempo (Elika, 2013).

La intoxicación alimentaria es debida a la capacidad que tiene *S. aureus* de producir enterotoxinas, denominadas “enterotoxinas estafilocócicas” (SE). Estas toxinas fueron identificadas por primera vez en 1914. Las enterotoxinas son proteínas exocelulares, se conocen distintas variantes, ordenadas por orden alfabético desde la A hasta la V, y con algunas sub-variantes como C1, C2 y C3, etc. La característica más relevante es la de ser extremadamente termorresistentes, ya que no pierden su actividad biológica si *S. aureus* las sintetiza antes de sufrir un tratamiento por encima de 45°C y resisten la ebullición a 100°C durante varias horas e incluso el autoclavado a 121°C más de 30 minutos; además son resistentes a las proteasas del tracto digestivo, en concreto a la pepsina segregada por el estómago, por lo que llegan intactas y activas hasta el intestino, donde son absorbidas (Caso, 2015).

El período de incubación es corto, generalmente tres horas después de la ingestión del alimento involucrado, ya que la intoxicación se produce por ingestión de la toxina. De acuerdo con la cantidad de toxina ingerida (una dosis de toxina de menos de 1 microgramo por alimento contaminado producirá los síntomas de intoxicación alimentaria; este nivel de toxina se alcanza cuando la población de *S. aureus* excede las 100.000 células por gramo), y según la susceptibilidad del individuo, el intervalo entre la ingestión y los primeros síntomas puede variar entre 2 y 12 horas. Los síntomas principales consisten en náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea.

Para que tenga lugar dicha intoxicación alimentaria es necesario que se den unas determinadas condiciones (Hennekinne y col., 2012):

- Que exista una fuente de contaminación que contenga cepas productoras de enterotoxinas: materias primas, equipos industriales, individuos portadores sanos o individuos infectados.
- Transferencia del patógeno desde la fuente de contaminación al alimento, lo que puede ocurrir por la utilización de utensilios contaminados, o por la manipulación del alimento por parte de personal infectado.
- Composición físico-química del alimento, temperatura favorable y tiempo suficiente para el crecimiento de *S. aureus* y la producción de toxinas.
- Ingestión de alimentos que contengan la cantidad suficiente de enterotoxinas para provocar los síntomas característicos de la intoxicación.

Las intoxicaciones alimentarias estafilocócicas tienen lugar generalmente por unas malas prácticas de higiene. Además, una mala refrigeración (ruptura de la cadena de frío) y conservación hacen que *S. aureus* prolifere, con la consiguiente producción de enterotoxina.

Las empresas alimentarias deben cumplir los criterios de seguridad alimentaria relativos a las enterotoxinas estafilocócicas en los alimentos de mayor riesgo (leche y quesos) establecidos en el Reglamento (CE) 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones. Asimismo, deben cumplir con los criterios de higiene de los procesos de fabricación relativos a los estafilococos coagulasa positivos establecidos en dicho Reglamento 2073/2005 (Elika, 2013).

En España, la toxiinfección estafilocócica no está incluida en el sistema de enfermedades de declaración obligatoria (sistema EDO), por lo que los datos acerca de su incidencia son los casos comunicados de forma voluntaria por las Comunidades Autónomas al Sistema de Información Microbiológica (SIM). Por lo tanto, la incidencia real de intoxicaciones alimentarias estafilocócicas está subestimada ya que esta cursa con una sintomatología relativamente leve, náuseas o vómitos (Argudín y col., 2010).

2.2. El género *Lactobacillus*

El grupo de las bacterias lácticas comprende 12 géneros, todos de la división *Firmicutes*, orden *Lactobacillales*. Las bacterias ácido lácticas pueden ser agrupadas en un solo grupo filogenético (Figura 2), junto a otras bacterias Gram positivas (como *S. aureus*) con bajo porcentaje de guanina y citosina (G+C) (Cermeño, 2012).

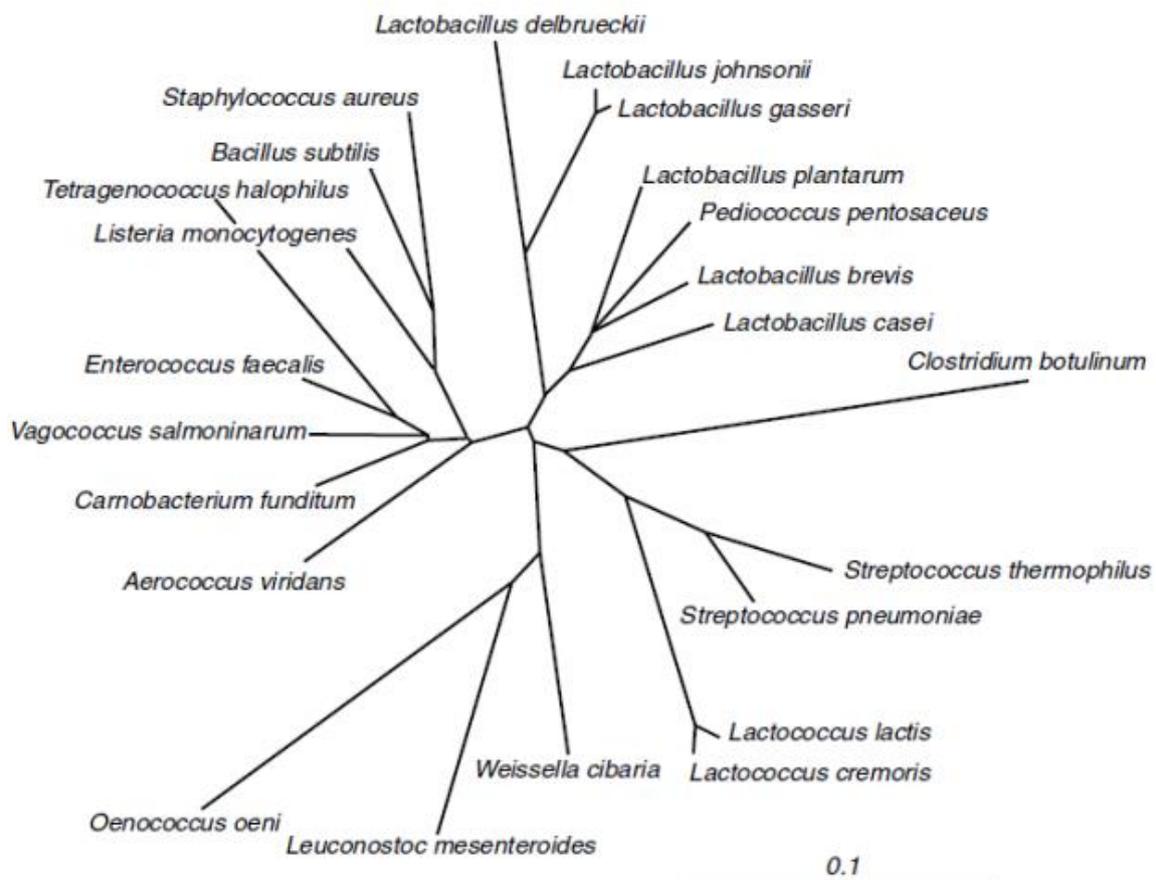


Figura 2. Árbol filogenético de las bacterias lácticas y otras bacterias Gram + (Cermeño, 2012)

El género *Lactobacillus* está formado por 80 especies. Son bacterias con forma de bacilos, cuya longitud y curvatura depende de la edad del cultivo, la composición del medio y la tensión de oxígeno, no forman esporas, son inmóviles, son catalasa negativas, ácido tolerantes y anaerobias facultativas (Cermeño, 2012).

A pesar de que el género *Lactobacillus* está generalmente asociado con sus funciones beneficiosas en los procesos de fermentación de alimentos, hay ciertos géneros como *L. plantarum* que puede actuar como bacterias de descomposición en la industria alimentaria.

2.2.1. *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum posee todas las características del género *Lactobacillus*. Es una bacteria láctica heterofermentativa facultativa, metabólicamente muy flexible y versátil que se encuentra en un gran rango de ambientes, incluyendo los productos lácteos o cárnicos fermentados y el tracto gastrointestinal humano (Figura 3) (Cermeño, 2012). Sin embargo, su nicho más habitual son los alimentos fermentados de origen vegetal.

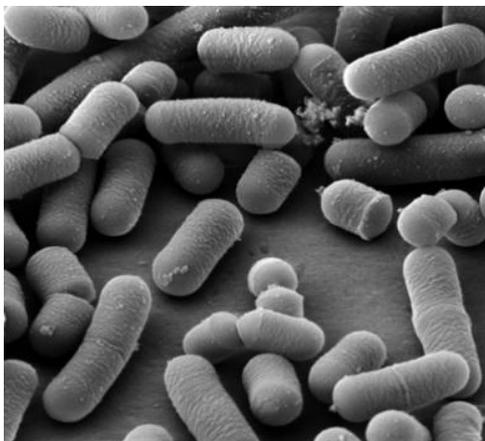


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de *L. plantarum*
(<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vinification>)

L. plantarum difiere del resto de especies del género *Lactobacillus* en los siguientes aspectos (Cermeño, 2012):

- Posee un genoma relativamente grande con numerosos genes que codifican su capacidad de adaptación a diversas condiciones.
- Puede fermentar gran cantidad de carbohidratos.
- Requiere una alta concentración de manganeso para su crecimiento, y lo acumula de manera intracelular. El manganeso provee a *L. plantarum* de una defensa frente al estrés oxidativo.
- Tiene una alta tolerancia al pH bajo lo que implica que frecuentemente predomine en fermentaciones ácido lácticas espontáneas e incluso, sea capaz de sobrevivir a través del tracto gastrointestinal humano.

Es una bacteria ampliamente utilizada como “starter” o cultivo iniciador, en productos vegetales o animales, como probiótico para humanos debido a sus actividades de mejora de la salud y últimamente como un vehículo para la producción de compuestos terapéuticos (Cermeño, 2012).

Este microorganismo también puede causar alteraciones en productos cárnicos (Aznar y Chenoll, 2006), y además, puede formar biofilms mixtos con la bacteria patógena *L. monocytogenes* (Van der Veen y Abee, 2011).

2.3. Biofilms

En los últimos tiempos, se ha puesto de manifiesto que las bacterias no se encuentran en el medioambiente exclusivamente de forma libre, comportándose como seres unicelulares, sino que en muchas ocasiones se encuentran formando parte de comunidades microbianas en lo que habitualmente se conoce como biofilms o biopelículas.

Un biofilm es una comunidad microbiana caracterizada por células sésiles que están unidas irreversiblemente a un sustrato o interfaz o entre sí, embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas producen (Domínguez y col., 2010). Estos dos estados que pueden adoptar las bacterias (forma planctónica o sésil) pueden diferenciarse fenotípicamente con respecto a la tasa de crecimiento y a la transcripción de genes.

La formación de biofilms parece ser una estrategia adaptativa de supervivencia bacteriana (Götz, 2002), ya que las células del interior del biofilm son más resistentes a los factores ambientales desfavorables que sus homólogas planctónicas. El crecimiento en biofilm ofrece importantes ventajas a las bacterias para su proliferación:

- La matriz orgánica polimérica ofrece protección a los microorganismos ya que crea un microambiente en el que las condiciones ambientales son más estables.
- Permite la supervivencia en nichos favorables, sin ser arrastrados de allí por el flujo de líquido.
- Facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación.
- La matriz orgánica polimérica confiere resistencia frente a la acción de agentes adversos como son biocidas, anticuerpos y macrófagos.
- Incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento.
- Se propicia por la cercanía las relaciones de comensalismo o cooperación entre organismos con aptitudes fisiológicas diferentes.
- Posibilita la transferencia de material genético (ADN), la proximidad favorece la transferencia horizontal de genes.

Debido a todos estos factores, los biofilms pueden tener graves repercusiones en la industria alimentaria. Por ello, es preciso eliminar todos los microorganismos de las superficies en contacto con los alimentos, antes de que las contaminen y establezcan un biofilm que puede servir de reservorio de microorganismos patógenos o alterantes (Piera, 2002).

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilms en diferentes superficies; conducciones, equipos y materiales. La presencia de biofilms puede conducir a la obturación de tuberías, filtros, válvulas y demás sistemas. Su aparición puede ser perjudicial e indeseable, puesto que en muchos casos producen contaminaciones del producto acabado, lo que se traduce en una disminución del periodo de conservación o incluso en una transmisión potencial de enfermedades (Domínguez y col., 2012).

Su presencia pone de manifiesto que hay que mejorar los sistemas de control de patógenos en la industria alimentaria. La opción más correcta sería prevenir la

formación de biofilms, pero actualmente no existe ninguna técnica o estrategia capaz de evitar dicha formación.

La principal consecuencia de que se formen biofilms en la industria alimentaria es la pérdida de seguridad en los productos si están constituidos por microorganismos patógenos. Por lo tanto, unas prácticas de higiene deficientes en las plantas procesadoras de alimentos pueden provocar un grave riesgo para la salud de los consumidores.

2.3.1. Estructura de un biofilm

Las bacterias cuando viven en una estructura de biofilm, están embebidas en un material polimérico que las mantiene unidas, y les confiere un estilo de vida peculiar, a diferencia de cuando se encuentran en un estado planctónico.

El material extracelular secretado por las células proporciona la forma tridimensional del biofilm y la capacidad de adherirse a las superficies (bióticas y abióticas), pero también es el canal de difusión de agua, nutrientes, oxígeno, enzimas y los restos celulares. El papel protector de esta matriz es muy importante porque las bacterias dentro de los biofilms son menos accesibles a los agentes antimicrobianos, a las defensas inmunológicas, a las fuerzas mecánicas, la desecación y la radiación ultravioleta (Flemming y Wingender, 2010).

La matriz extracelular está compuesta por una mezcla de compuestos poliméricos tales como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Nivens y col., 2001). En estafilococos la matriz está compuesta principalmente por el polisacárido de adhesión intercelular (PIA/PNAG) (β -1,6-N-acetilglucosamina). La matriz extracelular es muy variable entre las especies, incluso entre las cepas, y se puede modificar en función de las condiciones ambientales.

Cuando el biofilm está maduro, la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno se distribuye como un gradiente, generando así diferentes áreas que contienen células en diferentes etapas de diferenciación. En la capa superior, la abundancia de oxígeno permite que las células crezcan aeróbicamente, mientras que en la capa interior la limitación de nutriente y oxígeno, conduce a una actividad metabólica muy baja de células sésiles (Werner y col., 2004).

Una pequeña fracción de la población del biofilm está constituida por células durmientes o “persisters”, que sobreviven en un estado de latencia y son altamente tolerantes a los agentes antimicrobianos, y por lo tanto están destinadas a recuperar el biofilm después de un ataque antimicrobiano eventual (Lewis, 2005). La presencia de células “persisters”, que son tolerantes a los antimicrobianos, podría explicar al menos en parte la resistencia de los biofilms, a los biocidas.

2.3.2. Fases del desarrollo de un biofilm

La formación de un biofilm es un proceso dinámico y complejo que conlleva el ataque, colonización y crecimiento de microorganismos.

Las fases del desarrollo de un biofilm (Figura 4) son las siguientes (Otto, 2008):

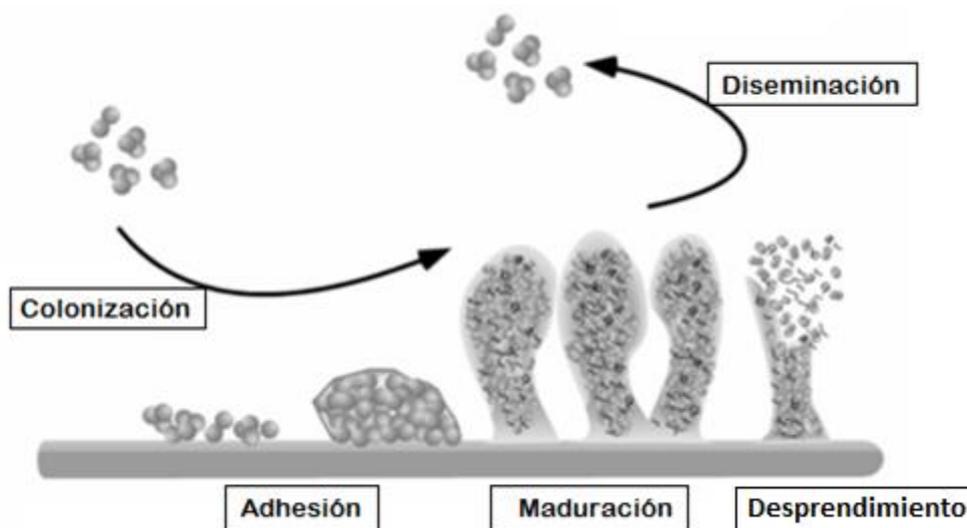


Figura 4. Fases del desarrollo de un biofilm (Modificada de Otto, 2008)

- **Adhesión inicial:** La unión inicial de las bacterias a la superficie es un paso reversible condicionado por interacciones hidrofóbicas o electrostáticas, y por lo tanto, depende de las propiedades físico químicas de la superficie abiótica y de la superficie de las células bacterianas. En este paso inicial, las bacterias detectan la superficie a través de apéndices externos como flagelos, pili, proteínas de la pared celular, adhesinas estructurales, polímeros extracelulares...

desencadenando una señal que induce la expresión de genes destinados a la formación del biofilm. En estafilococos, proteínas de la superficie como las autolisinas o los ácidos teicoicos también se han implicado en la interacción con la superficie. Las proteínas implicadas en la adhesión suelen ser Bap, Spa, FnBPA, FnBPB y SasG (Gutiérrez, 2014). Esta etapa inicial es crucial para la posterior colonización.

- **Maduración:** Después de la adhesión inicial, las células que forman el biofilm aumentan la producción del exopolisacárido. La síntesis de sustancias poliméricas (matriz) hace que la unión sea irreversible y les proporciona a las células bacterianas una adhesión entre ellas (Figura 5).

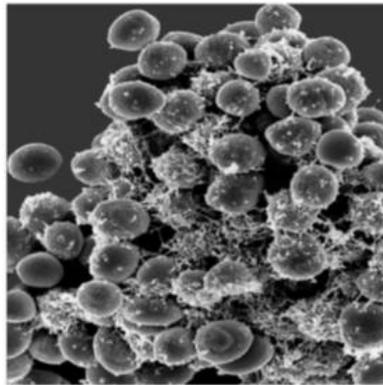


Figura 5. Biofilm formado por células estafilocócicas unidas por una matriz polisacáridica visualizado mediante microscopía electrónica de barrido (Otto, 2008).

En este momento el biofilm adquiere la estructura tridimensional y comienza la maduración. La fase de maduración en la formación del biofilm se caracteriza por:

- Agregación intercelular, que puede estar acompañada por una variedad de moléculas como proteínas adhesivas, o por lo general, por una base de polisacáridos o exopolisacáridos.
- Existencia de unas fuerzas estructurales en el biofilm, que conducen a la apariencia típica tridimensional de los biofilms maduros con sus torres de células de hongo que rodean los canales llenos de líquido. En el mantenimiento de esta estructura juegan un papel fundamental dos tipos de fuerzas: adhesivas (responsables de la agregación) y disruptivas (proporcionan la estructura del biofilm).

- Desprendimiento. Es crucial para la difusión de las bacterias a otros sitios de colonización. Puede ocurrir que se desprendan células individuales o grupos de células más grandes. Existen varios factores que pueden contribuir a este desprendimiento:
 - Expresión de los péptidos PSM (phenol-soluble-modulins), similares a tensioactivos, que también son importantes en la producción de la estructura tridimensional del biofilm.
 - Fuerzas mecánicas.
 - Cese de la producción de exopolisacárido.
 - Factores de desprendimiento, como enzimas que destruyen la matriz o surfactantes.
 - Factores externos como nutrientes, oxígeno, óxido nítrico, temperatura...

2.3.3. Capacidad de *S. aureus* de formar biofilms

La capacidad de *S. aureus* de formar biofilms en superficies de la industria alimentaria (Figura 6) puede ocasionar la contaminación de los productos alimentarios durante el proceso de elaboración, lo que significa un grave riesgo para la salud de los consumidores. Como se ha comentado previamente, la formación de biofilms facilita la supervivencia de la bacteria en ambientes poco favorables para su proliferación.

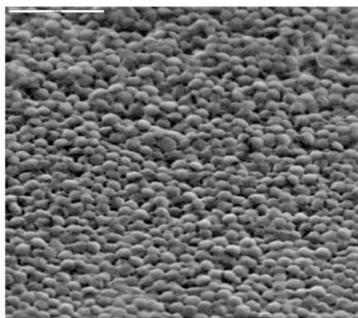


Figura 6. Micrografía LTSEM de un biofilm de 24 h formado por *S. aureus* (Gutiérrez y col., 2014)

Gutiérrez y col., en 2012, llevaron a cabo un estudio para determinar la presencia de *S. aureus* en las superficies y utensilios que están en contacto con los

Consideraciones teóricas y experimentales

alimentos (productos lácteos, carne y marisco), e identificaron la microbiota que coexiste con dicha bacteria en los biofilms.

Se realizó un muestreo de 442 muestras después de los procedimientos de limpieza y desinfección. La presencia de *S. aureus* tuvo una incidencia global del 6,1%.

La microbiota coexistente con *S. aureus* fue identificada por PCR-DGGE combinado con el análisis de la secuencia de los amplicones dominantes, poniéndose de manifiesto la presencia de bacterias que estaban, o bien involucradas en el deterioro de los alimentos, o bien eran preocupantes para la seguridad alimentaria en todos los ambientes (Tabla 2).

Banda	Organismo	Incidencia en las muestras (%)			
		Leche	Carne	Marisco	Total
1	<i>Lc. citreum</i>	100	50	69	71
2	<i>S. aureus</i>	100	100	100	100
3	<i>S. epidermidis</i>	-	-	23	14
4	<i>E. faecium</i>	50	-	-	10
5	<i>Pseudomonas sp.</i>	50	-	-	10
6	<i>Acinetobacter sp.</i>	25	100	-	24
7	<i>M. psychrotolerans</i>	-	50	-	10
8	<i>Str. uberis</i>	-	-	15	10
9	<i>L. plantarum</i>	25	100	-	24
10	<i>P. piscicida</i>	-	-	8	5
11	<i>Campylobacter sp.</i>	-	-	15	10
12	<i>M. caseolyticus</i>	25	-	-	5
13	<i>Psychrobacter sp.</i>	-	-	8	5
14	<i>Serratia sp.</i>	-	50	-	10
15	<i>Streptococcus sp.</i>	-	25	-	5
16	<i>B. cereus</i>	-	50	-	10

Tabla 2. Microbiota que coexiste con *S. aureus* en las superficies de la industria alimentaria (Gutiérrez y col., 2012)

Entre los microorganismos identificados destaca *L. plantarum* como una bacteria contaminante de los productos alimenticios como lo demuestra su presencia en todas las muestras de la industria cárnica analizadas y en un cuarto de las muestras de la industria láctea, que posee la capacidad de formar biofilms mixtos con *S. aureus*.

La capacidad de *S. aureus* para formar biofilms sobre distintos tipos de superficies (acero inoxidable y vidrio) ya ha sido puesta de manifiesto previamente por varios autores (Braz, 2007). Las superficies de vidrio presentaron una mayor capacidad de formación de biofilms, en comparación con las superficies de acero inoxidable, lo que puede explicarse por la carga eléctrica más alta del vidrio, y que fue visualizado mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 7).

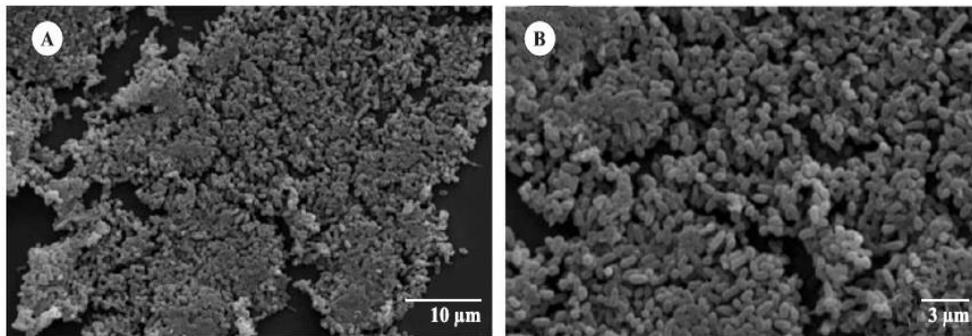


Figura 7. Micrográficas de células de *S. aureus* adheridas sobre superficies de vidrio (A) y sobre acero inoxidable, visualizadas por microscopía electrónica de barrido. (<http://www.scielo.br/img/revistas/bjm/v38n3/a29fig02.jpg>)

Asimismo, Zhan y col (2013), realizaron un estudio en el que se observa la capacidad de *S. aureus* de adherirse a superficies superhidrófobas, hidrofóbicas e hidrofílicas, observando, que a medida que transcurre el tiempo, la cantidad de células adheridas en las distintas superficies aumenta (Figura 8).

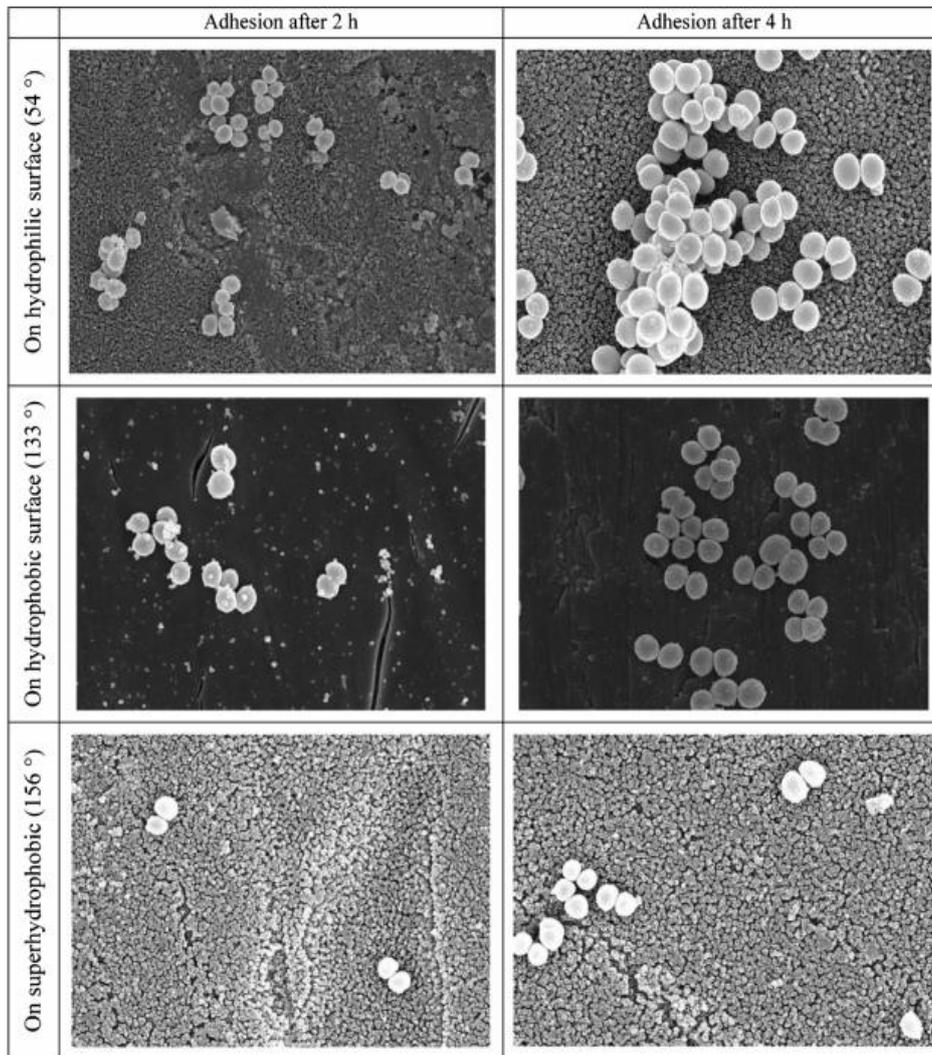


Figura 8. Micrografías electrónicas de barrido de la adherencia a superficies hidrofílicas, hidrofóbicas y superhidrofóbicas de *S. aureus* después de 2 y 4 horas (<http://pubs.rsc.org/en/content/pdf/article/2013/ra/c3ra40497h>).

2.4. Bacteriófagos

2.4.1. Características generales

Los bacteriófagos, también denominados fagos, son virus que infectan solamente a bacterias con una elevada especificidad de huésped. Cada partícula fágica (virión) contiene un genoma de ácido nucleico (ADN o ARN) dentro de una envuelta proteica o lipoproteica, denominada cápsida. Este conjunto es conocido como nucleocápsida (Guttman y col., 2005) (Figura 9).

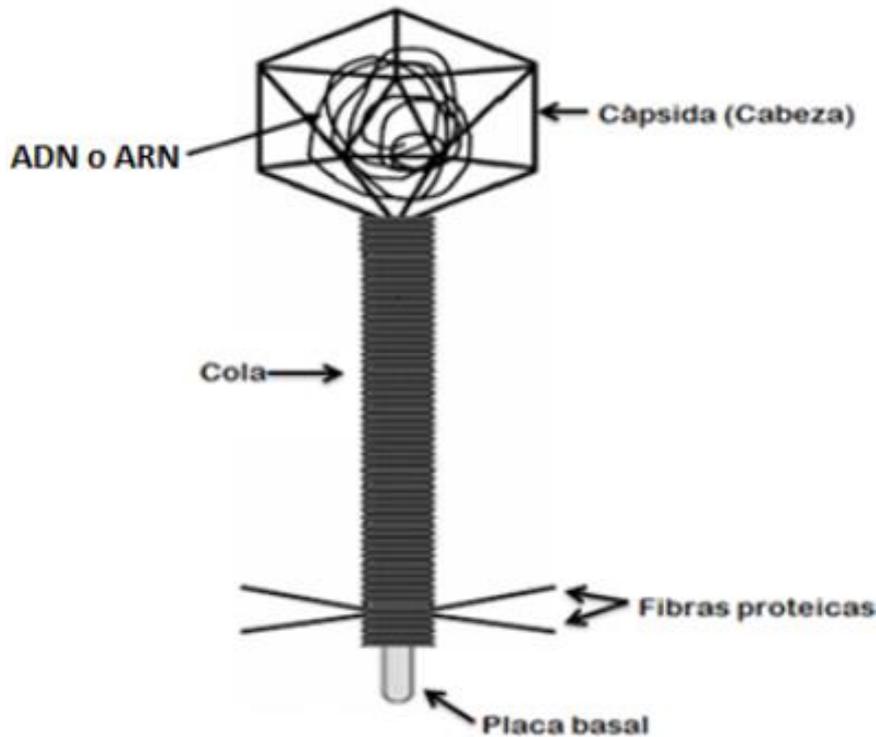


Figura 9. Representación esquemática de un bacteriófago. (Modificado de García, 2011).

Los fagos son las entidades biológicas más abundantes en la naturaleza; se han aislado de todos los ambientes explorados, habiéndose estimado que hay cerca de 10^{31} fagos en la Tierra, e identificado aproximadamente 5.500 (García y col., 2011). Su ubicuidad se debe a que los fagos proliferan en los ambientes que colonizan sus huéspedes bacterianos, ya que necesitan de su maquinaria celular para multiplicarse.

El descubrimiento de los bacteriófagos se remonta a 1896, momento en el que el bacteriólogo británico Ernest Hankin evidenció la presencia de actividad antimicrobiana frente a *Vibrio cholerae*. A pesar de este primer contacto científico con los bacteriófagos, no sería hasta 1915 de la mano de Frederick Twort el momento en el que se infiriese que la actividad antimicrobiana era debida a la presencia de virus. De forma independiente, Félix d'Herelle, científico del instituto Pasteur de París, anunció en 1917 su descubrimiento. Esta es la razón por la que se considera actualmente a Twort y D'Herelle los codescubridores de los fagos.

Estos virus infectan las células bacterianas con una elevada especificidad de huésped, lo que ha hecho de los bacteriófagos una herramienta útil en el diagnóstico de laboratorio para la identificación de bacterias patógenas (fago-tipificación). Esta fago-

tipificación es utilizada frecuentemente en los laboratorios de referencia con propósitos epidemiológicos.

Por otra parte, la capacidad de los fagos para invadir bacterias y alterar su metabolismo causándoles la muerte ha abierto líneas de investigación orientadas a su posible uso para eliminar biofilms de las superficies de las industrias alimentarias, contribuyendo eficazmente a mejorar la seguridad de los alimentos. No obstante, hay que tener presente que también es necesario para ello un buen diseño higiénico de procesos, instalaciones y equipos, además de un sistema de gestión eficaz de limpieza y desinfección.

La clasificación más utilizada en la actualidad fue propuesta por Ackermann según la cual existen 13 familias de fagos que se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas (Figura 10):

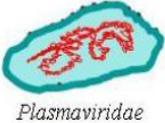
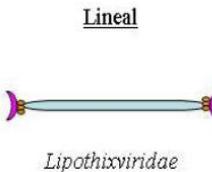
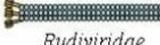
	CON ENVUELTA	SIN ENVUELTA
A D N	ADN de doble cadena <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <u>Circular</u>  <i>Plasmaviridae</i> </div> <div style="text-align: center;"> <u>Lineal</u>  <i>Lipothixviridae</i> </div> </div> <div style="margin-top: 10px;">  <i>Fuselloviridae</i> </div> <div style="margin-top: 10px;">  <i>Guttaviridae</i> </div>	ADN de doble cadena <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <u>Circular</u>  <i>Corticoviridae</i> </div> <div style="width: 45%;"> <u>Lineal</u> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <i>Myoviridae</i> </div> <div style="text-align: center;">  <i>Sphoviridae</i> </div> <div style="text-align: center;">  <i>Podoviridae</i> </div> </div> <div style="margin-top: 10px;">  <i>Rudoviridae</i> </div> <div style="margin-top: 10px;">  <i>Tectiviridae</i> </div> </div> </div>
		ADN monocatenario <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <u>Circular</u>  <i>Microviridae</i> </div> <div style="width: 45%;"> <u>Lineal</u>  <i>Inoviridae</i> </div> </div>
A R N	ARN de cadena doble: lineal  <i>Cystoviridae</i>	ARN monocatenario: lineal  <i>Leviviridae</i>

Figura 10. Clasificación de los bacteriófagos según su morfología y ácido nucleico (Ackermann, 2009).

2.4.2. Ciclo biológico

Tras la infección de la bacteria huésped, los bacteriófagos pueden seguir dos tipos de ciclo de desarrollo (Figura 11):

- Ciclo de desarrollo lítico: Los bacteriófagos se multiplican en la célula bacteriana y al final del ciclo se produce la lisis de la bacteria, dando lugar a la liberación de las partículas recién formadas. Este ciclo se lleva a cabo en 7 pasos (García, 2011):
 - Adsorción de la partícula a la superficie de la célula bacteriana huésped. Este paso se ve facilitado por una serie de fibras que se encuentran en la cola del bacteriófago y que se unen a moléculas específicas en la superficie de la bacteria, denominadas receptores de fagos.
 - Inyección del ácido nucleico en el citoplasma de la bacteria huésped.
 - Expresión de los genes tempranos del fago.
 - Replicación del genoma del fago en múltiples copias.
 - Expresión de los genes tardíos del fago, involucrados en la formación de nuevas partículas de fago y la lisis de la bacteria huésped.
 - Ensamblaje de las cabezas y las colas, empaquetamiento del ácido nucleico en el interior y maduración de los viriones.
 - Lisis de la bacteria huésped y liberación de la nueva progenie para comenzar un nuevo ciclo.
- Ciclo de infección lisogénico: El genoma del bacteriófago se integra en el genoma de la bacteria huésped. Ambos genomas (el de la bacteria y el del bacteriófago) se replican juntos. En este estado el fago se denomina profago o fago atemperado, y la bacteria lisógeno, pudiendo así permanecer en estado latente.

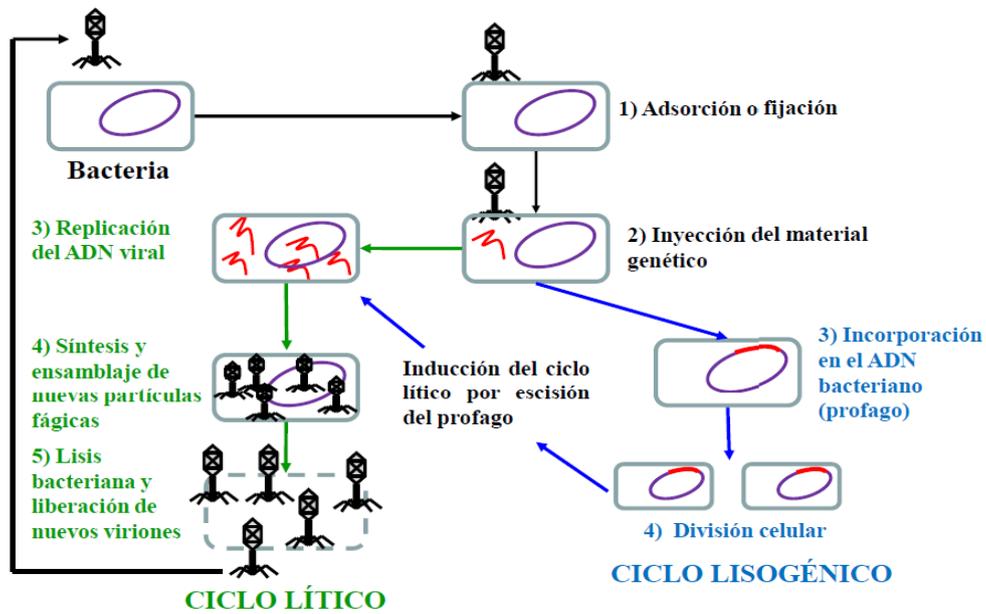


Figura 11. Representación esquemática de las diferentes etapas de los ciclos de vida de un bacteriófago (Gutiérrez y col., 2010).

Durante la generación de la progenie fágica, pueden distinguirse los periodos denominados eclipse y latencia (Figura 12). El primero abarca desde la inyección del ADN fágico hasta la formación de los viriones maduros en el citoplasma bacteriano. El segundo comprende desde la inyección del ADN fágico hasta que las nuevas partículas fágicas son liberadas al medio. La progenie fágica desarrollada en el interior de la bacteria infectada se conoce como tamaño de explosión. Todos estos parámetros son específicos de cada fago y dependen del huésped y del medio ambiente (Guttman y col., 2005).

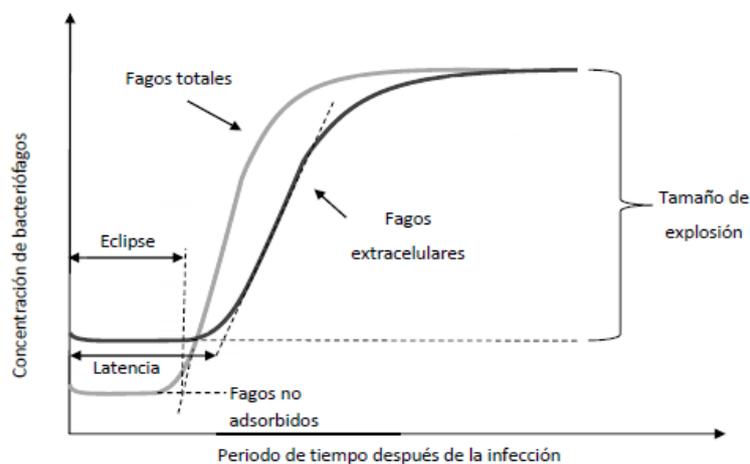


Figura 12. Fases del ciclo lítico de los bacteriófagos (Augusto, 2011)

2.4.3. Ventajas e inconvenientes de utilizar bacteriófagos en la industria alimentaria

Los bacteriófagos pueden ser utilizados para el control de microorganismos patógenos a lo largo de todo el proceso de producción y elaboración de alimentos de origen animal y vegetal (García y col., 2008):

- Animales que pueden actuar como reservorio (fagoterapia).
- Canales y productos crudos de origen animal y vegetal (biocontrol).
- Superficies y utensilios de producción (biohigienización).
- Como conservantes naturales en productos manufacturados perecederos para aumentar su vida útil (biopreservación).

Algunas de las propiedades que presentan los bacteriófagos son especialmente adecuadas para su utilización como agentes de biocontrol en la industria alimentaria, entre ellas se pueden citar las siguientes (García y col., 2011):

- Su especificidad y capacidad auto-replicante.
- La eficacia en producir la lisis bacteriana, es decir, la muerte celular cuando una determinada bacteria entra en contacto con un fago en una multiplicidad de infección (MOI) elevada.
- Su inocuidad para los seres humanos cuando se ingieren.
- No alteran las propiedades organolépticas de los alimentos, ni produce cambios en el color, la textura o el sabor.
- Las endolisinas, proteínas fágicas responsables de la liberación de la nueva progenie viral, no generan resistencia bacteriana.

Por otra parte, hay unos requerimientos específicos que deben cumplir los bacteriófagos para ser seleccionados para su uso en la industria alimentaria. Entre ellas cabe destacar la capacidad de infección del mayor número de cepas posible de la bacteria a eliminar. Asimismo, los bacteriófagos virulentos son los de elección para: el tratamiento de infecciones en animales o vegetales, la descontaminación de los alimentos durante su procesado, las superficies que entren en contacto con éstos, o la descontaminación de los alimentos ya listos para consumo, ya que la infección de una bacteria por los mismos garantiza la lisis bacteriana completa, no siendo así en el caso

de los fagos atemperados (Brüssow, 2005). Además de esto, a la hora de emplear un fago en la lucha contra una bacteria debe conocerse que éste no posee en su material genético ningún gen de virulencia o de resistencia a antibióticos, que pudiesen ser incorporados a las células objeto de infección transfiriéndole las propiedades codificadas en ellos.

Entre las desventajas se pueden citar (García y col., 2011):

- Los fagos pueden ser portadores de genes de virulencia. Para evitar que exista algún riesgo es necesario obtener las secuencias del genoma del fago completo y realizar el análisis bio-informático de las mismas; así se minimiza la selección de fagos que pudieran transmitir genes no deseables a la población bacteriana a la que van a infectar.
- Estrecho rango de huésped. Esto es una ventaja, pero también puede ser un inconveniente, ya que pudiera haber cepas que sobreviven a la infección.
- Las bacterias pueden desarrollar resistencia a la infección por bacteriófagos por mutación o por pérdida del sitio receptor.
- El estado metabólico de la población. Los bacteriófagos infectan bacterias preferiblemente en crecimiento exponencial.
- Inactivación de los bacteriófagos por las condiciones ambientales de los alimentos.
- Las proteínas líticas de los bacteriófagos no lisan exógenamente las bacterias Gram negativas, debido a que la capa de peptidoglicano está rodeada por la membrana externa, lo que las hace resistentes a la actividad de la endolisina.

2.4.4. Susceptibilidad de los biofilms a los bacteriófagos

Teóricamente, un biofilm debería ser rápidamente infectado porque las células están más cerca unas de otras y este hecho podría favorecer la replicación del fago. Sin embargo, la estructura y composición del biofilm, así como la fisiología de las células del biofilm, pueden imponer algunas limitaciones a su infección (Sharma y col., 2005; Azeredo y Sutherland, 2008). Esto se debe a que la matriz del biofilm puede plantear un serio obstáculo para la penetración del fago, limitando la difusión del fago hacia el interior del biofilm. Además el biofilm es un reservorio de enzimas proteolíticas como

las endoglucanasas que pueden llevar a la inactivación del fago (Azeredo y Sutherland, 2008). Sin embargo, algunos fagos poseen enzimas que degradan las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y por lo tanto, son capaces de romper la estructura del biofilm y facilitar el acceso de los fagos al biofilm (Azeredo y Sutherland, 2008; Hudson y col., 2010). Además, existe evidencia del incremento de la susceptibilidad a los desinfectantes cuando los biofilms son previamente tratados con la enzima polisacárido despolimerasa de fagos. En consecuencia, se obtiene una mejor eliminación del biofilm (Tait y col., 2002).

Sin embargo, la oportunidad de conseguir un fago específico con una alta capacidad lítica y, preferiblemente, que exprese una enzima que degrade el EPS, es de baja probabilidad. La ingeniería genética puede jugar un papel importante en este proceso, ya que puede modificar genéticamente los fagos para alterar su gama de huéspedes e inducir la producción de despolimerasa (Azeredo y Sutherland, 2008).

La presencia de células muertas y la reducida actividad metabólica de las células del biofilm, también son consideradas una dificultad en la progresión de la infección. Debido a que la infección de los fagos y su ciclo vital, en general, dependen fuertemente de la etapa de crecimiento de su huésped bacteriano y las células muertas pueden servir sólo como receptoras de partículas virales, pero no como huéspedes para su multiplicación (Azeredo y Sutherland, 2008).

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas utilizadas principalmente en este trabajo fueron *S. aureus* RN 450 y *L. plantarum* cepa 55-1. Ambas se conservaron a -80°C en sus medios óptimos: *S. aureus* en caldo triptona-soja (TSB) y *L. plantarum* en medio líquido MRS (Scharlau, Barcelona, España), conteniendo glicerol al 20% (v/v) de concentración final.

S. aureus RN 450, es un derivado no lisogénico de la cepa *S. aureus* NCTC 8325 (Novick, 1967).

L. plantarum 55-1 es una cepa derivada de la cepa parental *L. plantarum* LPCO10. Esta cepa fue aislada originalmente de una fermentación de aceitunas y se ha demostrado que es productora de dos bacteriocinas (S y T). Tras el tratamiento de LPCO10 con novobiocinas (antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces niveus*) se obtuvo la cepa *L. plantarum* 55-1, no productora de bacteriocinas (Ruiz-Barba y col., 1994).

S. aureus se creció en medio líquido TSB (Triptona Soy Broth, Scharlau) a 37°C, con agitación (para tener condiciones de aerobiosis). En medio sólido se utilizó TSB al 2% (p/v) de agar (TSA). Para el crecimiento selectivo de la bacteria se utilizaron placas de Agar BP (Agar Baird Parker, Scharlau, Barcelona, España) que se incubaron a 37°C durante 24 h.

El crecimiento de *L. plantarum* se realizó en medio líquido MRS a 32°C, sin agitación. Para el crecimiento en medio sólido se usaron placas de MRS con agar al 2% (p/v) a 32°C durante 24-48 h.

Para la obtención de colonias aisladas de ambas cepas bacterianas se llevó a cabo el procedimiento siguiente: Los stocks conservados a -80°C de cada una de las cepas bacterianas se sembraron por estría sobre una placa de medio sólido BP para *S. aureus* y una placa de medio sólido MRS para *L. plantarum* (Figura 13).

Material y métodos

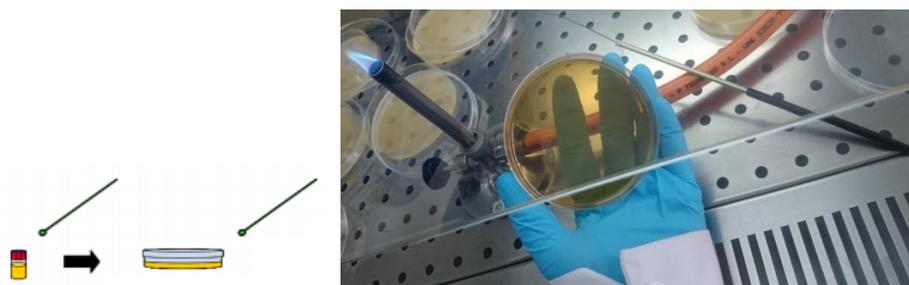


Figura 13. Se introduce el asa de siembra en el stock de cada una de las cepas bacterianas y se siembra por estría en las placas Petri con el medio correspondiente.

Una vez sembradas las placas, se incubaron a 37°C y 32°C respectivamente. Tras 18 h, (en el caso de *L. plantarum* puede tardar un poco más), se observaron colonias aisladas (Figura 14) de cada una de las especies.



Figura 14. Izquierda: Colonias aisladas de *S. aureus* sembradas por estría en medio sólido BP. Derecha: Colonias aisladas de *L. plantarum* sembradas por estría en medio sólido MRS.

Para la reactivación de las colonias que se forman en las placas se realizaron cultivos de 18 horas (overnight, o/n). Para ello, se inocularon 2 ml de TSB (*S. aureus*) o 4 ml de MRS (*L. plantarum*), con una colonia aislada previamente de la placa, y se incubaron durante toda la noche.

3.2. Cálculo del número de células en los cultivos de 18 horas (o/n)

Para conocer cuántas células hay exactamente en los cultivos o/n utilizados para generar los biofilms se realizaron diluciones seriadas (hasta la dilución 10^{-7}) de dichos

Material y métodos

cultivos. Para ello, se utilizaron tubos Eppendorf con 900 μl de solución RINGER (NaCl 0.1 M; KCl 4 mM; CaCl_2 2 mM) y 100 μl de la muestra.

A continuación se sembraron 100 μl de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} en placas de BP y de MRS, en caso de que sea *S. aureus* o *L. plantarum*, respectivamente, (Figura 15) mediante un asa de Digralsky.



Figura 15. Izquierda: diluciones seriadas en tubos Eppendorf con 900 μl de RINGER; Derecha: Siembra con asa de Digralsky en placa BP.

Una vez sembradas estas diluciones, se introdujeron las placas de Petri de *S. aureus* a 37°C y las de *L. plantarum* a 32°C . Al día siguiente se procedió al recuento de las colonias, preferentemente en placas que contuvieran entre 30 y 300 colonias.

La concentración de viables de cada cultivo se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$UFC/ml = n \times 1/c \times 1/v$$

Donde;

- n es el número de colonias que aparecieron aisladas.
- C es la dilución del cultivo que se sembró.
- V es el volumen de cultivo que se añadió en la placa.

3.3. Curvas de crecimiento

Para la elaboración de las curvas de crecimiento en medio líquido de las bacterias *S. aureus* y *L. plantarum* se utilizaron cultivos o/n de cada una de ellas, los cuales se diluyeron 1:100 y 1:10 en TSB + 0,25% (p/v) de glucosa, medio en el que se

Material y métodos

van a llevar a cabo los ensayos de formación de biofilms. Se utilizaron alícuotas de 200 µl de cada una de estas diluciones para inocular cada pocillo de una placa microtiter de 96 pocillos de poliestireno (*TC Microwell 96U w/lid nunclon D SI, Thermo scientific, NUNC*).

A continuación se introdujo la placa de microtiter en un lector de placas (*Benchmark Plus*) y se determinó la DO a 600 nm cada 20 minutos, durante 6 h. La placa se mantuvo en condiciones estáticas, agitándose ligeramente durante 12 s antes de realizar cada medida.

3.4. Formación de biofilms monoespecie y mixtos.

El procedimiento consistió primeramente en formar los biofilms en placas microtiter de 96 pocillos de poliestireno. Para ello, se obtuvieron cultivos o/n, a partir de los cuales se realizaron diluciones 1:100.

De cada una de las diluciones se tomaron 200 µl que se añadieron en los pocillos correspondientes de la placa microtiter. Además se establecieron pocillos “control” donde únicamente se pipetearon 200 µl de TSB + 0,25% de glucosa. La placa se incubó a 32°C, durante 3 h, 5 h, 8 h o 24 h.

3.4.1. Determinación de la biomasa de un biofilm

Como medida estimada de la formación del biofilm se utilizó la tinción con cristal violeta. Para ello, tras la incubación de la placa de microtiter a 32°C durante 3 h, 5 h, 8 h o 24 h para permitir la formación de los biofilms, ésta se invirtió con un golpe seco para retirar el cultivo de los pocillos, permaneciendo el biofilm adherido a las paredes de estos. A continuación, para que los pocillos tengan únicamente adherido el biofilm y para eliminar los posibles restos de matriz disuelta o células en suspensión no ancladas en la matriz polimérica del biofilm, se realizó un lavado con 200 µl de PBS (NaCl 37 mM, KCl 2.7 mM pH 7,3, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) y se invirtió de nuevo la placa microtiter para eliminarlos.

Material y métodos

Para teñir el biofilm formado en cada pocillo se añadieron 200 μl de cristal violeta ($\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{ClN}_3$) al 0,1% (p/v). Se dejó reposar durante 15 minutos. Transcurrido dicho tiempo, la placa microtiter se sumergió en agua para eliminar el exceso. Acto seguido, se añadieron 200 μl de ácido acético al 33% (v/v), cuya función fue solubilizar el cristal violeta. Se dejó actuar otros 15 min, y a continuación se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas.

3.4.2. Cálculo del número de células viables en los biofilms formados.

Transcurrido el tiempo de incubación, la placa microtiter se invirtió con un golpe seco para eliminar el medio de cultivo en condiciones de esterilidad. A continuación, se lavaron los pocillos con 200 μl de PBS (Figura 16).



Figura 16. Lavado de las células adheridas con PBS.

El siguiente paso fue analizar el contenido de células viables en el biofilm. Para ello, se realizó un frotis sobre toda la superficie interna de cada uno de los pocillos con un par de hisopos estériles, tras lo cual se introdujeron ambos hisopos en un tubo de ensayo con 9 ml de PBS (Figura 17).

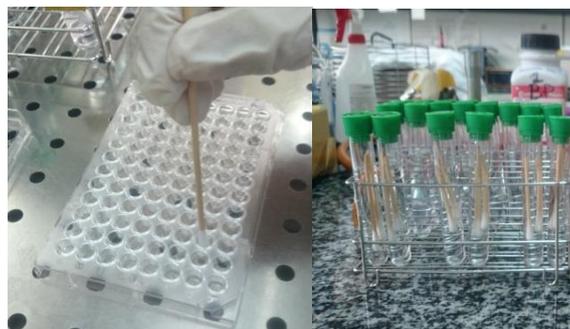


Figura 17. Recogida de las células adheridas con hisopos estériles.

Material y métodos

Inmediatamente, los tubos se agitaron durante un minuto en un agitador vórtex y, a continuación, se llevaron a cabo las diluciones seriadas correspondientes para sembrarlas en placas de BP y MRS mediante el método de siembra en sábana. Se extendieron 100 µl de cada dilución por placa, mediante un asa de Digralsky.

Las placas de BP y MRS se incubaron a 37°C o 32°C respectivamente, hasta el día siguiente, procediéndose al recuento de las colonias. La concentración de viables de cada placa se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$UFC/ml = n \times 1/C \times 1/V \times 9$$

Donde;

- n es el número de colonias que aparecieron aisladas
- C es la dilución del cultivo que se sembró
- V es el volumen de cultivo que se añadió a la placa
- 9 son los 9 ml de PBS en los cuales se disolvió el biofilm recogido con los hisopos en cada pocillo.

3.5. Propagación del bacteriófago ϕ IPLA-RODI en medio sólido

El bacteriófago ϕ IPLA-RODI fue aislado en nuestro laboratorio y su caracterización se describe en Gutiérrez y col. (2015).

Para su propagación se utilizó la cepa *S. aureus* IPLA-1 (Gutiérrez y col., 2012), añadiendo a placas de medio de TSA 100 µl de cultivos de una noche de dicha cepa y 100 µl de la suspensión fágica para obtener una lisis confluyente o semiconfluyente, siguiendo el método de la doble capa.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. A continuación se añadieron 3 ml de SM (NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM, Ca(NO₃)₂ 10 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2), y se dejó en agitación suave durante 2 h. Seguidamente, se recogió el sobrenadante, y se centrifugó a 16100 x g durante 30 min, se filtró y se precipitó con PEG 8000 (30% p/v). Finalmente, se dializó frente a tampón SM, se filtró y se tituló.

Material y métodos

3.5.1. Cálculo del título de una suspensión fágica

Para determinar el título de una suspensión fágica se realizaron diluciones seriadas de la misma en tampón SM. Posteriormente se pipetearon 100 µl de cada una de estas diluciones, y se mezclaron con 100 µl de una dilución 1:10 de un cultivo o/n de la cepa huésped *S. aureus* IPLA-1.

La mezcla se incubó a 32°C durante 15 minutos y se sembró sobre una placa de TSA (2% agar) mediante el método de la doble capa. Una vez solidificado, se incubó a 32°C durante 24 h. Al día siguiente se procedió al recuento de las placas de lisis.

El título de la suspensión fágica se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$UFP/ml = n \times 1/C \times 1/V$$

Donde;

- n es el número de placas de lisis que aparecieron aisladas
- C es la dilución de la suspensión fágica que se sembró
- V es el volumen de la dilución de la suspensión fágica que se añadió en la placa.

3.6. Determinación de la sensibilidad/resistencia a fagos en medio sólido.

3.6.1. Test del “spot o gota”.

Este test permite distinguir si una cepa bacteriana es sensible o no a determinados fagos. Es un ensayo cualitativo, no cuantitativo.

Para llevar a cabo este test se utilizó un cultivo en fase estacionaria de la cepa a ensayar (*S. aureus* RN 450) (cultivos crecidos durante toda la noche en medio líquido). A una placa de TSA se añadieron 100 µl del cultivo o/n de la cepa de *S. aureus*. A continuación, y utilizando el método de la doble capa, se vertieron 5 ml de agar TSB semisólido (0,7% p/v) suplementado con Ca(NO₃)₂ y MgSO₄ (10 mM de concentración final), y se agitó suavemente en círculos, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

Material y métodos

Posteriormente, se colocó en la placa una gota de 5 μ l de la suspensión fágica a ensayar, se dejó secar, y se incubó a 37°C toda la noche.

El crecimiento esperado es un césped en el que se observan placas de lisis (o un halo de lisis), en el lugar donde se depositó la gota. Esto indicará que la bacteria es sensible al fago. De lo contrario, si crece un césped uniforme, la bacteria será resistente al fago.

3.6.2. Cálculo de la multiplicidad de infección (MOI)

La multiplicidad de infección (MOI, “multiplicity of infection”) que indica la relación entre fagos y bacterias utilizada, se calculó dividiendo el número de fagos (UFP) entre el número de bacterias (UFC), en un determinado volumen de mezcla de infección.

3.7. Tratamiento de biofilms de *S. aureus* y *L. plantarum* con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI

En primer lugar, se formaron los biofilms en las placas microtiter de 96 pocillos. Para ello se utilizaron las condiciones óptimas descritas con anterioridad (medio de cultivo TSB (0.25% glucosa), y 32 °C) y se pipetearon 200 μ l de las diluciones 1:100 de las bacterias *L. plantarum* 55-1, *S. aureus* RN-450y la mezcla de ambas.

Transcurridas 5 h se retiró el medio de cultivo invirtiendo la placa con un golpe seco, en condiciones de esterilidad, y se lavaron los pocillos con 200 μ l de PBS, para eliminar los posibles restos de matriz disuelta o células en suspensión no ancladas a la matriz polimérica del biofilm.

A continuación se aplicó el tratamiento con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI. Para ello se añadieron 200 μ l de las distintas concentraciones de la suspensión fágica con dosis de 10^7 y 10^8 UFP/ml. Como tratamiento control se añadieron 200 μ l de SM a los pocillos correspondientes, a fin de cuantificar la influencia del “lavado” del biofilm por el método mecánico de arrastre.

Material y métodos

Cada fila de la placa se utilizó para los distintos tiempo de tratamiento: 0 h, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h. Nada más añadir las concentraciones de la suspensión fágica a toda la placa microtiter, se recogió la fila correspondiente a las 0 h. Para ello se extrajo el medio de cultivo, con la micropipeta, permaneciendo así los biofilms adheridos a la superficie interior del pocillo Una vez realizado el frotis de los pocillos de las 0 h para analizar el contenido de células viables en los biofilms formados, según el apartado 3.3.2, la placa microtiter se volvió a introducir nuevamente en la estufa a 32°C. Este procedimiento se repitió a las 1 h, 2 h, 3 h y 4 h de tratamiento.

Finalmente, para la medida estimada de la formación del biofilm se tiñó la placa microtiter con cristal violeta, según apartado 3.3.1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

S. aureus es una bacteria que tiene una gran capacidad de formar biofilms y por lo tanto, constituye una fuente importante de contaminación en las industrias alimentarias. Por otro lado, *L. plantarum* se encuentra en muchos alimentos fermentados como son los productos lácteos y cárnicos, por lo que está presente de manera frecuente en las instalaciones alimentarias. De hecho, en trabajos previos de nuestro grupo de investigación se detectó su presencia en superficies de la industria alimentaria, formando parte de los biofilms que contienen *S. aureus* (Gutiérrez et al., 2012). La presencia de ambas especies impulsó el desarrollo de un modelo de laboratorio que permitiese el estudio de este tipo de biofilms mixtos.

Inicialmente se realizaron una serie de experimentos preliminares para evaluar las condiciones de crecimiento en medio líquido más adecuadas para *S. aureus* RN 450 y *L. plantarum* y 55-1, Asimismo, se evaluaron distintos medios de cultivo en placa para facilitar el recuento diferencial de ambos microorganismos. (Tabla 3).

		37 °C		32 °C	
		<i>L. plantarum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>S. aureus</i>
Medio sólido	PCA	√	√	√	√
	BP		√√ negro		√ negro
	KF	√		√	
	MRS	√		√√	
	BC		√ blanca		
	CHROMagar		√√ morada		√√ morada
Medio líquido	PCB		√ _{24h}	√ _{48h}	√ _{24h}
	2×TY		√ _{24h}	√ _{24h}	√ _{24h}
	TSB + 0,25% glucosa	√ _{48h}	√√ _{24h}	√√ _{24h}	√√ _{24h}

Tabla 3. Crecimiento de *L. plantarum* 55-1y *S. aureus* RN-450 en distintos medios de cultivo y a distintas temperaturas.√ Representa que hay crecimiento bacteriano y √√ representa las condiciones en las que el crecimiento es óptimo. Los colores especifican la tonalidad de las colonias en el medio.

A partir de estos resultados se definieron las condiciones más adecuadas para el crecimiento conjunto de ambos microorganismos:

- Medio líquido TSB + 0,25% de glucosa, debido a que ambos microorganismos crecen de forma similar.

Resultados y discusión

- Temperatura de 32°C.
- Tiempo de incubación 5 h.

Como medios de cultivo para el recuento diferencial de los citados microorganismos se utilizarán placas BP para *S. aureus* y placas MRS-agar para *L. plantarum*.

Una vez decidido el medio líquido (TSB 0.25% Glucosa) que se utilizará para crecer ambas bacterias, se realizaron ensayos de las posibles interacciones de *S. aureus* con *L. plantarum*. De esta manera, se analizó si se producen interacciones antagónicas o no, mediante la comparación del crecimiento de las bacterias de manera individual o en combinación. Los resultados mostraron que no existe ningún efecto inhibitorio por parte de ninguna de las dos bacterias (Figura 18).

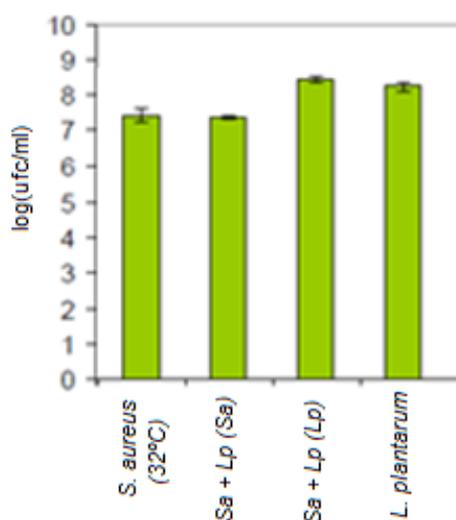


Figura 18. Ensayo de crecimiento en TSB+0,25% glucosa de las bacterias *S. aureus* RN 450 y *L. plantarum* 55-1 a 32°C. Ambas bacterias se crecieron individualmente y combinadas. En los cultivos conjuntos se indica entre paréntesis la especie para la que se realizó el recuento. Sa: *S. aureus*; Lp: *L. plantarum*

4.1. Determinación de la curva de crecimiento de *S. aureus* y *L. plantarum* en medio líquido.

Como paso previo a los estudios que se plantean en este trabajo, se procedió a determinar la curva de crecimiento de cada una de las dos especies que van a formar parte de los biofilms mixtos. Esto va a permitir estimar la tasa de crecimiento de las bacterias (μ) y el tiempo de generación (g) en el medio en el que éstas se desarrollarán

Resultados y discusión

(TSB+ 0,25% de glucosa), el cual permite crecer a ambos microorganismos aunque normalmente no se emplea para el crecimiento de *L. plantarum*. Para ello, se partió de cultivos en fase exponencial de cada una de las bacterias y se realizaron diluciones, 1:10 y 1:100, de las cuales se tomaron 200 μ l para añadir a los pocillos de la placa microtiter.

Una vez inoculada la placa se introdujo en el lector de placas, y se incubó a 32°C durante 6 h, midiendo la OD a 600 nm cada 20 min. Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 19.

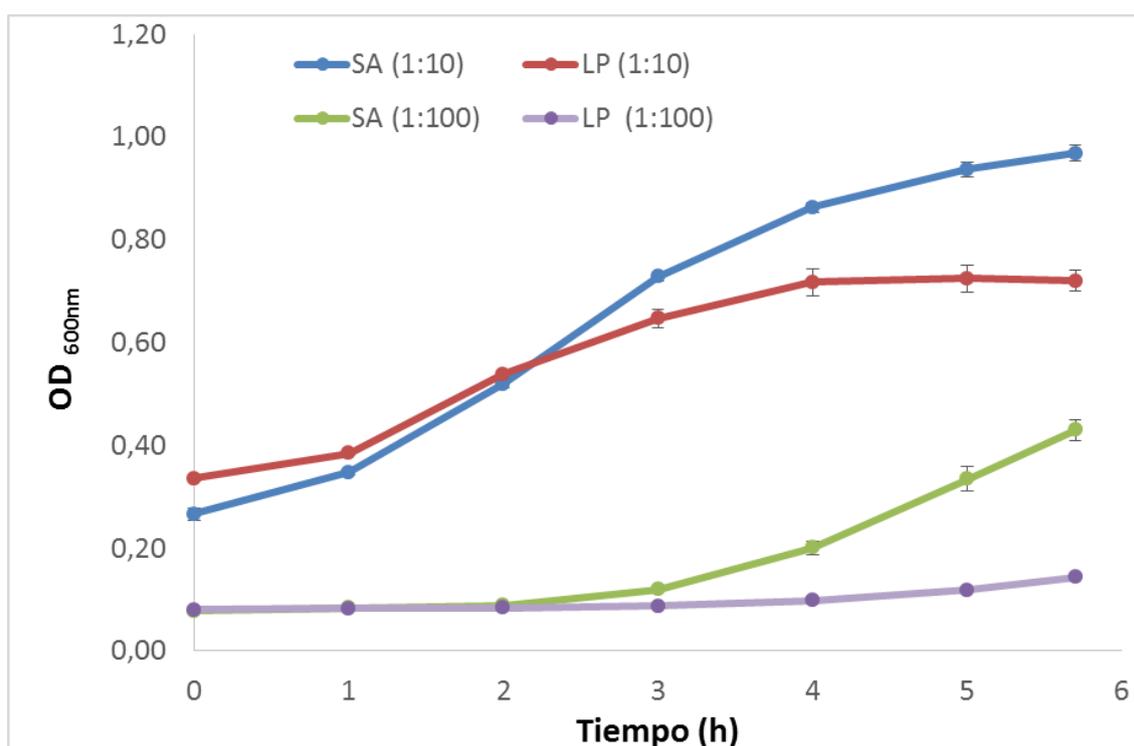


Figura 19. Curva de crecimiento de las especies bacterianas (SA: *S. aureus* RN 450y LP: *L. plantarum* 55-1) en cultivo líquido, inoculado con diferentes concentraciones bacterianas (inóculos diluidos 1:10 y 1:100).

Las curvas de crecimiento obtenidas para ambas especies bacterianas muestran un largo período de latencia (2-2,5 h) cuando se utiliza el inóculo más diluido (dilución 1:100), y, consecuentemente, fases exponenciales más cortas durante el período de incubación estudiado. La dilución 1:10 permite alcanzar mayor densidad óptica (mayor concentración bacteriana) en ambos microorganismos, en los que apenas se observa fase de latencia. En este caso, ambos crecen paralelamente durante 2 h, y a partir de ese momento, el crecimiento de *S. aureus* supera claramente al de *L. plantarum*, aunque éste también alcanza niveles notables. A partir de la fase exponencial de estas gráficas

Resultados y discusión

(cuando el crecimiento de la bacteria es máximo) se calcularon los parámetros cinéticos *tasa o velocidad específica de crecimiento* (μ), que se define como la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo y se expresa en h^{-1} , y el *tiempo de generación* (g), que es el tiempo que la población bacteriana precisa para duplicar su número (o densidad óptica) y se expresa en h. Para realizar los cálculos es necesario que exista una relación lineal entre la concentración bacteriana (DO) y el tiempo, y esto se consigue representado gráficamente la misma en logaritmos (p.e. logaritmos neperianos, Ln) frente al tiempo, lo que permite obtener la recta de regresión lineal correspondiente ($y = ax + b$), donde “y” es Ln de la densidad óptica del cultivo, “a”, la pendiente de la recta, “x” es el tiempo de incubación, y “b” es el punto donde la recta corta el eje de ordenadas. La pendiente de la recta (a) nos permite calcular la tasa de crecimiento ($\mu = a/Ln2$) y el tiempo de generación ($g=1/\mu$) (Stephenson, 2012).

Las rectas de regresión obtenidas para cada especie bacteriana fueron las siguientes:

- *S. aureus* (1:10): $y = 0,4049x - 1,4601$ ($R^2 = 0,9954$)
- *S. aureus* (1:100): $y = 0,5131x - 3,6616$ ($R^2 = 0,9968$)
- *L. plantarum* (1:10): $y = 0,3788x - 1,3298$ ($R^2 = 0,9968$)
- *L. plantarum* (1:100): $y = 0,2741x - 3,4993$ ($R^2 = 0,9991$)

Los elevados coeficientes de determinación R^2 obtenidos en cada ecuación indican un perfecto ajuste de los datos de densidad óptica de los cultivos a las rectas de regresión. Los valores de tasa de crecimiento y tiempo de generación calculados se indican en la Tabla 4:

Cepa (inóculo)	Tasa de crecimiento $\mu = a/Ln2$ (h^{-1})	Tiempo de generación ($g=1/\mu$) (h)
<i>S. aureus</i> (1:10)	0,5841	1,7118
<i>S. aureus</i> (1:100)	0,7402	1,3509
<i>L. plantarum</i> (1:10)	0,5464	1,8298
<i>L. plantarum</i> (1:100)	0,3954	2,5288

Tabla 4. Parámetros de crecimiento de las cepas *S. aureus* RN 450 y *L. plantarum* 55-1 en medio TSB+0.25% glucosa incubados a 32°C durante 6 h.

Resultados y discusión

A pesar de obtener los valores más elevados de densidad óptica en los cultivos de *S. aureus* en los que se utilizó como inóculo la dilución 1:10, la tasa de crecimiento más elevada ($0,7402 \text{ h}^{-1}$) fue detectada en los cultivos inoculados con la dilución 1:100, lo que podría ser debido a que dichos cultivos aún no alcanzaron la fase estacionaria al final del tiempo de incubación. Sin embargo, esto no ocurre en los cultivos de *L. plantarum* en los que la tasa de crecimiento más elevada ($0,5474 \text{ h}^{-1}$) se detectó en los realizados con inóculos menos diluidos.

Una vez determinado que el medio TSB+0,25% glucosa y la temperatura de incubación permiten el crecimiento de ambas especies bacterianas en cultivo líquido, decidimos utilizar estas condiciones para desarrollar el modelo de laboratorio de formación de biofilms mixtos.

4.2. Estudio de los biofilms formados con *S. aureus* y *L. plantarum*

Como se ha indicado en el apartado 3.3, para llevar a cabo la formación de un biofilm el primer paso fue disponer de los cultivos de 18 h (o/n) de *S. aureus* y de *L. plantarum*, y a partir de éstos se desarrollaron los biofilms en placas microtiter de 96 pocillos, en cada uno de los cuales se estudió la biomasa y el número de células viables.

4.2.1. Determinación del número de bacterias de los cultivos a las 18 horas (o/n)

Inicialmente se procedió a determinar el número exacto de bacterias que están presentes en los cultivos o/n, los cuales se utilizaron como inóculo para la generación de los biofilms. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de dichos cultivos, se sembraron por duplicado en placa y se incubaron durante 24 h como se indicó en el apartado 3.2. La concentración alcanzada por los cultivos de 18 h (o/n) fue 10^8 UFC/ml para *S. aureus* y 10^9 UFC/ml para *L. plantarum*.

Resultados y discusión

4.2.2. Evolución en la biomasa total de biofilms monoespecie y mixtos de *S. aureus* y *L. plantarum*.

En este experimento se realizaron tres replicas biológicas, lo que equivale a tres colonias diferentes de cada especie bacteriana (tres o/n), debido a que entre las colonias puede haber diferencias genéticas, de tal manera que realizando diferentes replicas biológicas se va a ver si todas expresan el mismo fenotipo. Además también se realizaron dos replicas técnicas (duplicados) porque así se puede controlar el error experimental y humano.

Para determinar la evolución de los biofilms a lo largo del tiempo de incubación, se procedió a medir su biomasa (material extracelular + bacterias adheridas) mediante tinción con cristal violeta (apartado 3.3.1). Los resultados se muestran en la Figura 20.

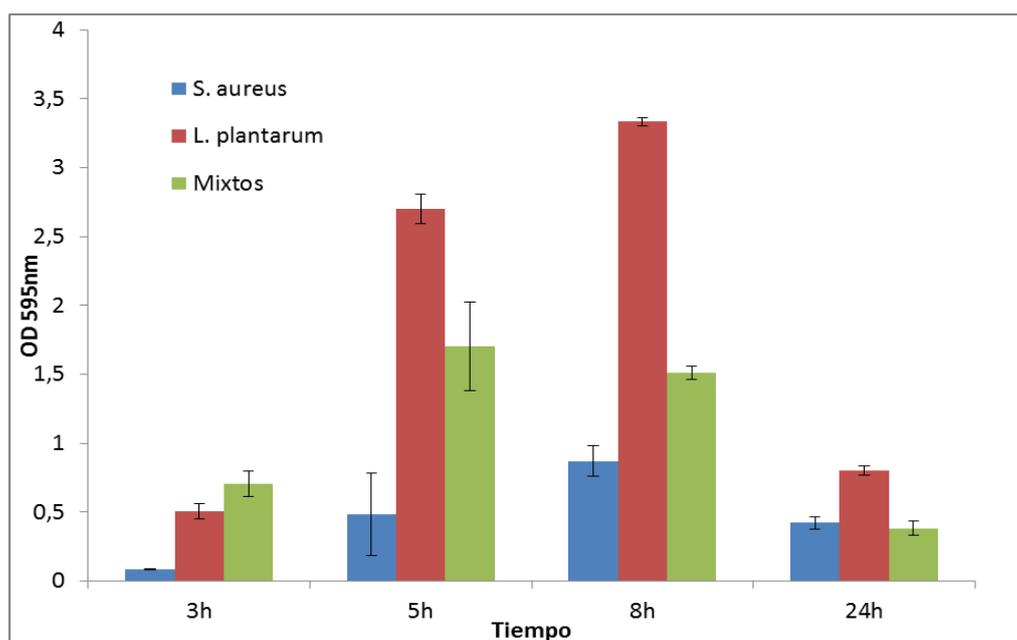


Figura 20. Biomasa total determinada mediante tinción con cristal violeta en biofilms monoespecie y mixtos de *S. aureus* RN-450 (SA) y *L. plantarum* 55-1 (LP) incubados a 32°C durante 3, 5, 8 y 24 h.

A las 3 h de incubación a 32°C los biofilms están poco desarrollados, como lo demuestra el hecho de que apenas hay biomasa. Esta sigue aumentando progresivamente, tanto en los biofilms monocultivo como mixtos, al menos hasta las 8 h. Entre las 8 y las 24 h se ha producido la maduración del biofilm, observándose al

Resultados y discusión

final del período una notable disminución de la biomasa debido a que el biofilms está en fase de desprendimiento. Además, cabe destacar que durante todo el período de incubación, existe una gran diferencia en cuanto a la biomasa de los biofilms mono-especie de *S. aureus* y *L. plantarum*, siendo claramente superior en este último. Los biofilms de 5 h fueron seleccionados para el posterior tratamiento de los mismos con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI.

4.2.3. Cuantificación de células viables por pocillo

Para determinar la cantidad de células del biofilm formado en los pocillos de la placa microtiter, se siguió el procedimiento indicado en el apartado 3.3.2.

Tras sembrar las diluciones correspondientes, se procedió a realizar el recuento de las células viables según la fórmula indicada en el apartado 3.3.2.

El resultado de los recuentos de bacterias viables adheridas a los biofilms se muestra en la Figura 21

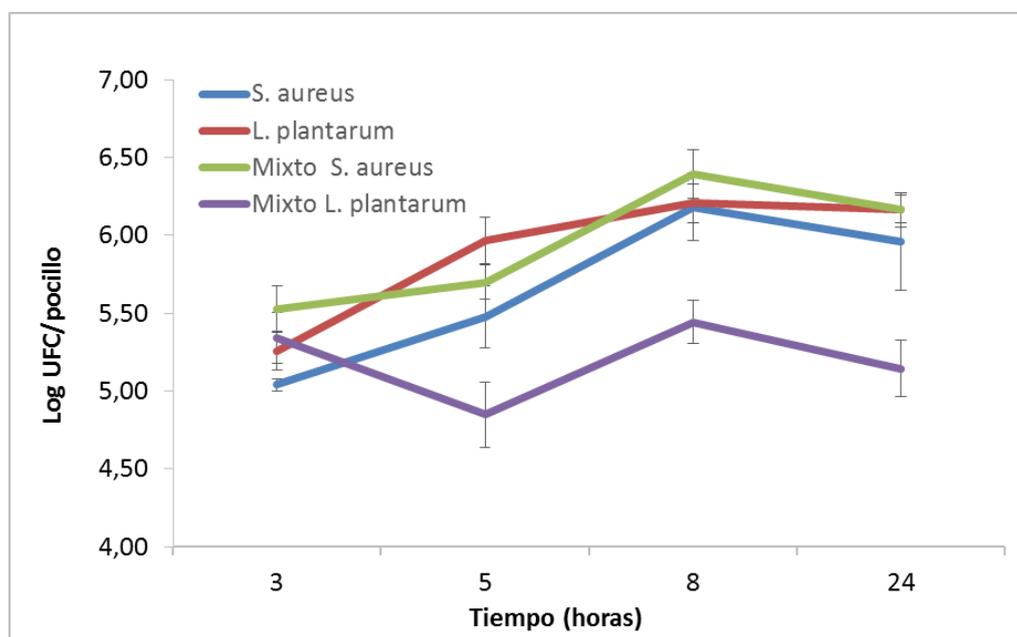


Figura 21. Desarrollo de biofilms mono-especie y mixtos de *S. aureus* RN-450 (SA) y *L. plantarum* 55-1 (LP) en el que se representa el número de células adheridas por pocillo

Resultados y discusión

A las 3 h el número de bacterias viables se encuentra en torno a 10^5 UFC/pocillo, tanto en monocultivo como en biofilm mixto. A las 5 h hay un aumento de las células viables de *S. aureus* en ambos tipos de biofilms. Sin embargo, las células viables de *L. plantarum* adheridas a biofilms mixtos se mantienen en niveles muy inferiores a las adheridas a biofilms monoespecie a lo largo del período de incubación. En todos los casos, se observa un descenso del número de células adheridas a las 24 h, que coincide con los niveles más bajos de biomasa previamente observados.

Los resultados apuntan a que la formación de biofilms mixtos entre *S. aureus* y *L. plantarum* parece facilitar el aumento de células viables del primero, lo que incrementa el riesgo de contaminación de los productos procesados en las instalaciones agroalimentarias.

4.3. El bacteriófago ϕ IPLA-RODI

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha evaluado positivamente el uso de fagos como agentes de control biológico en los alimentos (EFSA, 2009), aunque sugiere la necesidad de profundizar en este tipo de estudios. Por ello, el éxito de la aplicación de los fagos y productos de origen fágico (p.e. enzimas líticos) en los alimentos estará determinado por la inversión en estudios sobre la seguridad, la transmisión correcta de información sobre los productos, la situación reglamentaria y la aprobación de los gobiernos, y la decisión final del consumidor (García, 2011).

En este proyecto se utilizó el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (Figura 22), que es un fago virulento perteneciente a la familia *Myoviridae*. Presenta un amplio rango de huésped y posee un genoma de 142.348 pb con 213 pautas abiertas de lectura (Gutiérrez y col., 2015).



Figura 22. Bacteriófago Φ IPLA-RODI visualizado mediante microscopía electrónica de transmisión (Gutiérrez y col., 2015)

Estudios previos indican que los bacteriófagos son capaces de eliminar la formación de biofilms (Gutiérrez y col., 2015) y evitar por tanto la dispersión de biofilms maduros. La capacidad lítica de este fago se ensayó previamente frente a células planctónicas de estafilococos, así como frente a biofilms monoespecie y mixtos, formados por *S. aureus* IPLA-16 y *Staphylococcus epidermidis*. Los resultados mostraron que el tratamiento con el fago puede eliminar 5 unidades logarítmicas en cultivos planctónicos y 2 unidades logarítmicas en biofilms, tras 8 h de tratamiento.

A pesar de los resultados positivos obtenidos con la cepa *S. aureus* IPLA 16, consideramos necesario estudiar la capacidad del fago Φ IPLA-RODI para lisar la cepa *S. aureus* RN 450 en estado planctónico antes de ensayarlo frente a biofilms mixtos en los que está presente esta cepa.

4.3.1. Tratamiento de cultivos planctónicos de *S. aureus* con el bacteriófago Φ IPLA-RODI

En el presente trabajo se estudió la eficacia del tratamiento con el bacteriófago Φ IPLA-RODI frente a células planctónicas de *S. aureus* RN 450 (cepa utilizada en este estudio) y *S. aureus* IPLA-16. Esta última cepa, citada en el apartado anterior, se utilizó como control dada su conocida sensibilidad al fago

Disoluciones 1:100 y 1:1000 de cultivos líquidos de *S. aureus* RN450 y de *S. aureus* IPLA-16 se infectaron con el bacteriófago Φ IPLA-RODI utilizando MOIs 1, 10 y 100 (Figura 23 y 24).

Resultados y discusión

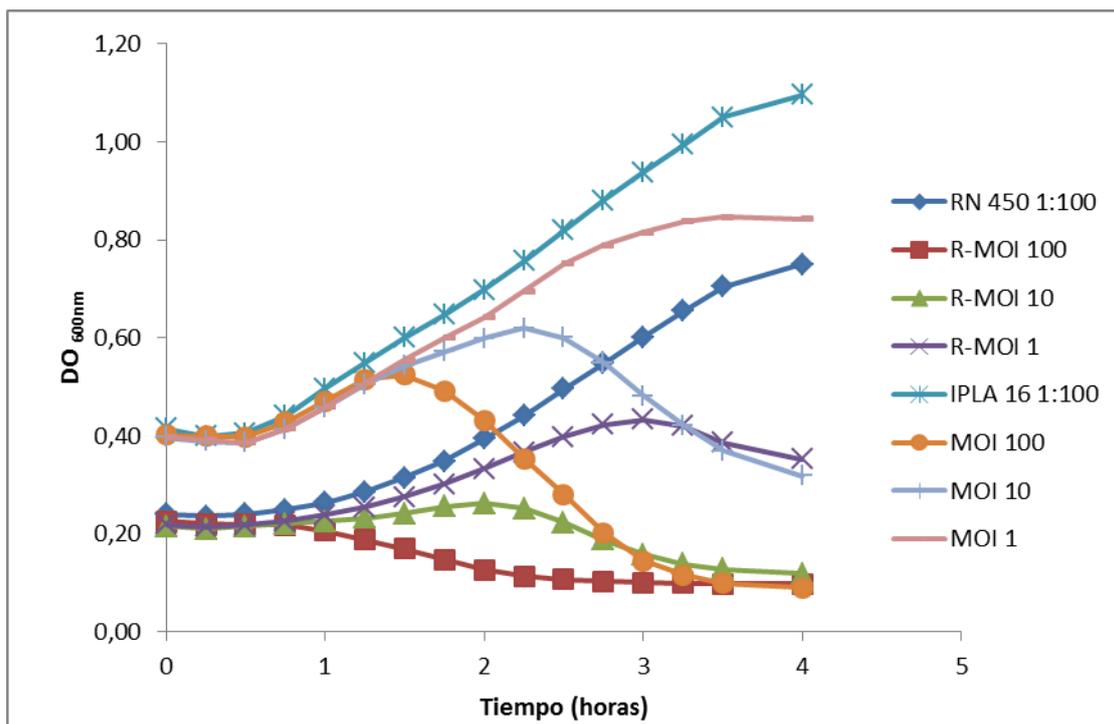


Figura 23. Evolución del crecimiento (inóculo diluido 1:100) de *S. aureus* RNA 450 (SA) y *S. aureus* IPLA-16) infectados con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOIs 1, 10 y 100).

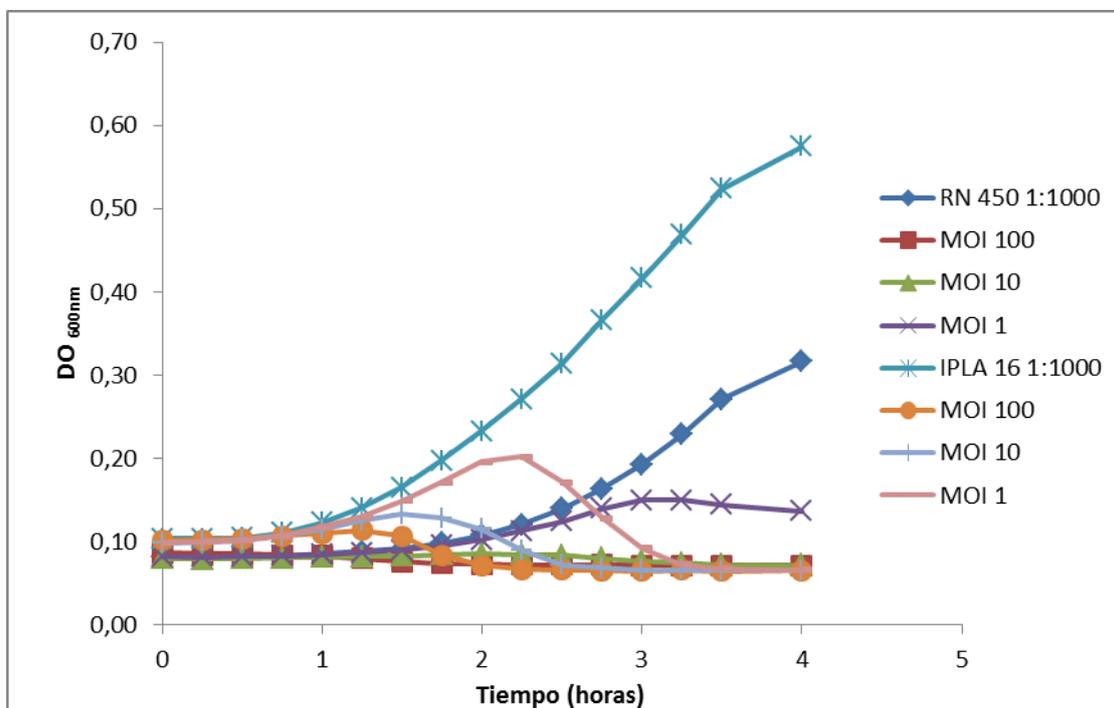


Figura 24. Evolución del crecimiento (inóculo diluido 1:1000) de *S. aureus* RNA 450 (SA) y *S. aureus* IPLA-16 infectados con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOIs 1, 10 y 100)

Resultados y discusión

En ambas figuras se puede observar cómo el bacteriófago ϕ IPLA-RODI, cuando se utiliza con MOIs de 10 y 100, elimina las células planctónicas de ambas cepas bacterianas, ya que disminuye significativamente la absorbancia de los cultivos.

4.4. Tratamiento de biofilms de *S. aureus* y *L. plantarum* con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI

Una vez comprobada la sensibilidad de la cepa *S. aureus* RN 450 al fago ϕ IPLA-RODI en cultivo líquido, se procedió a determinar dicha sensibilidad cuando la cepa se encuentra formando biofilms, tanto monoespecie como mixtos.

El objetivo de este experimento fue definir la concentración necesaria de bacteriófagos que debe aplicarse a los biofilms de *S. aureus* RN-450 y *L. plantarum* 55-1 para que se produzca la mayor eliminación de biomasa total, cuantificada mediante tinción con cristal violeta y del número de células viables.

Para ello, se formaron biofilms de 5 h a 32°C y posteriormente se les aplicó el tratamiento con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI, como se indicó en el apartado 3.5. En la placa se utilizó como medio de cultivo y como blancos TSB + 0,25% de glucosa.

Los biofilms preformados se trataron con el bacteriófago. Como control se utilizaron pocillos a los que se añadió tampón SM y como tratamiento, la suspensión fágica de 1×10^7 UFP/ml (MOI de 10) y 1×10^8 UFP/ml (MOI de 100). Los pasos a seguir se describieron en el apartado 3.5.

4.4.1. Evaluación de la eficacia del bacteriófago mediante cuantificación de la biomasa total

La cuantificación de la biomasa de los biofilms preformados tras el tratamiento fágico se llevó a cabo según se describió en el apartado 3.3.1, y los resultados se muestran en la Figura 25.

Resultados y discusión

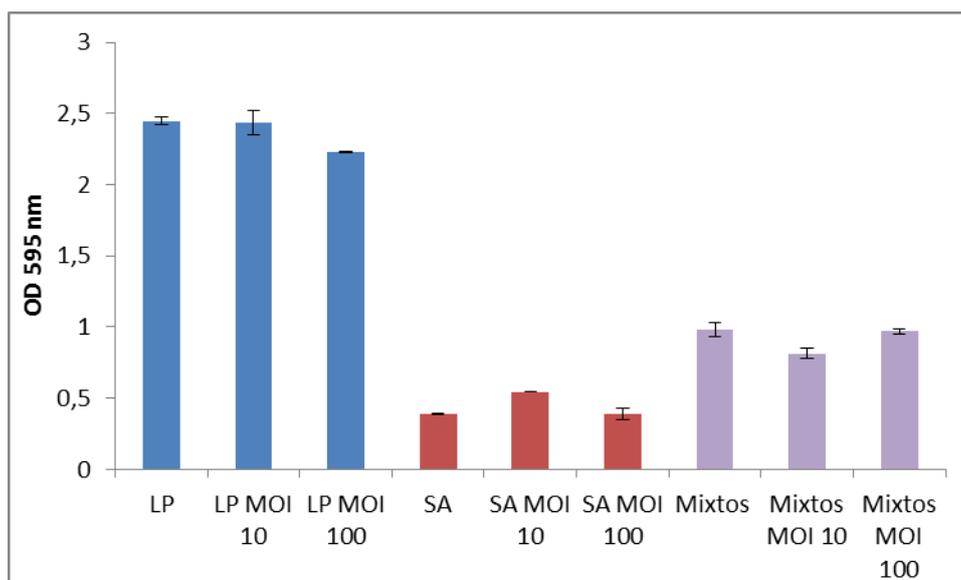


Figura 25. Biomasa total de biofilms preformados de 5 h de *S. aureus* RN 450 y *L. plantarum* 55-1 y tratados con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOI 10 y 100) durante 4 h.

Como se puede observar en la figura, la cantidad de biomasa no presenta grandes variaciones en los biofilms producidos por *L. plantarum* cuando se realiza el tratamiento con MOI 10 o con una MOI 100, como es esperable. Sin embargo, tampoco parece verse afectada la biomasa de biofilms monoespecie y mixtos en los que está presente la cepa sensible *S. aureus* RN 450.

4.4.2. Evaluación de la eficacia del bacteriófago mediante la técnica del recuento de viables

El efecto del tratamiento fágico sobre la erradicación o reducción de células viables en los biofilms monoespecie y mixtos se llevó a cabo según se indica en el apartado 3.5

Tras la incubación de las diluciones adecuadas sembradas en placas Petri, se procedió al recuento de las colonias crecidas. Los resultados de los recuentos se expresaron en Log UFC/pocillo solamente a las 0 y 4 h, debido a que en tiempos intermedios (1, 2 y 3 h), los datos fueron muy semejantes (Figura 26).

Resultados y discusión

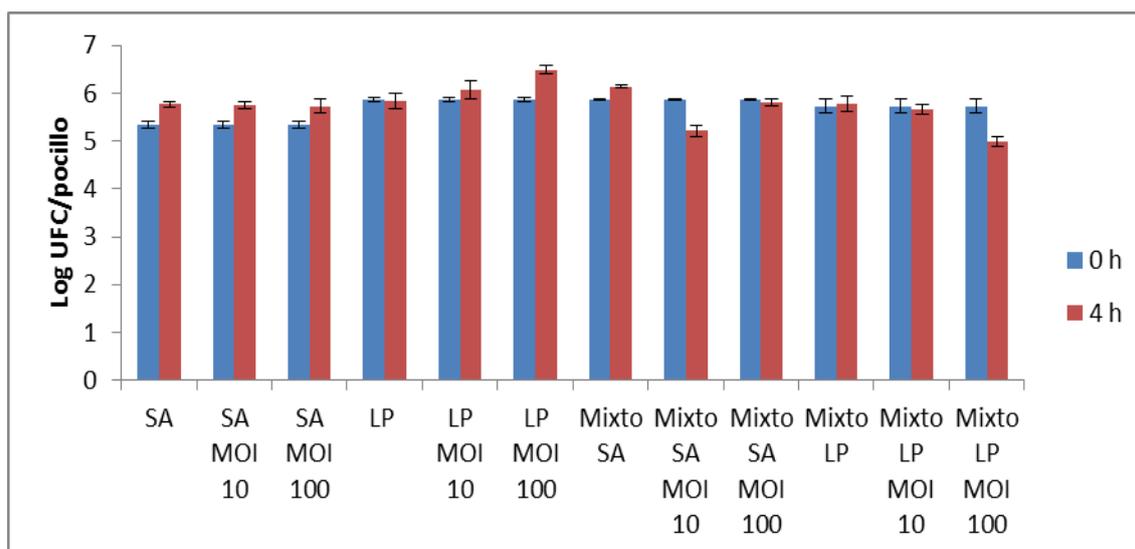


Figura 26. Evolución de células viables adheridas de *S. aureus* RN 450 y *L. plantarum* 55-1 a biofilms preformados de 5 h tras el tratamiento con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOIs 10 y 100) durante 4 h.

Se puede concluir que tras el tratamiento con el bacteriófago a diferentes tiempos no se ve ningún resultado concluyente, debido a que no hay descenso en el número de bacterias viables prácticamente ninguno de los ensayos, con ninguna de las dos MOIs utilizadas.

4.5. Alternativa al tratamiento de biofilms de *S. aureus* y *L. plantarum* con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI

Dado que con los datos obtenidos anteriormente no se pudo confirmar la efectividad del fago sobre biofilms, pues estos no se vieron afectados, ya que ni reducía la cantidad de biomasa ni el número de células viables, se planteó como alternativa aumentar la MOI del tratamiento a 1000. Se siguieron todos los pasos explicados anteriormente, con la salvedad de que se procedió únicamente a determinar lo que ocurre a las 0 h y a las 4 horas del tratamiento con el bacteriófago, sin tomar muestras a tiempo intermedios.

Una vez formados los biofilms de 5 h, se llevó a cabo el tratamiento con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI. Para cuantificar la cantidad de biomasa, se realizó la tinción con cristal violeta, obteniéndose los siguientes resultados (Figura 27):

Resultados y discusión

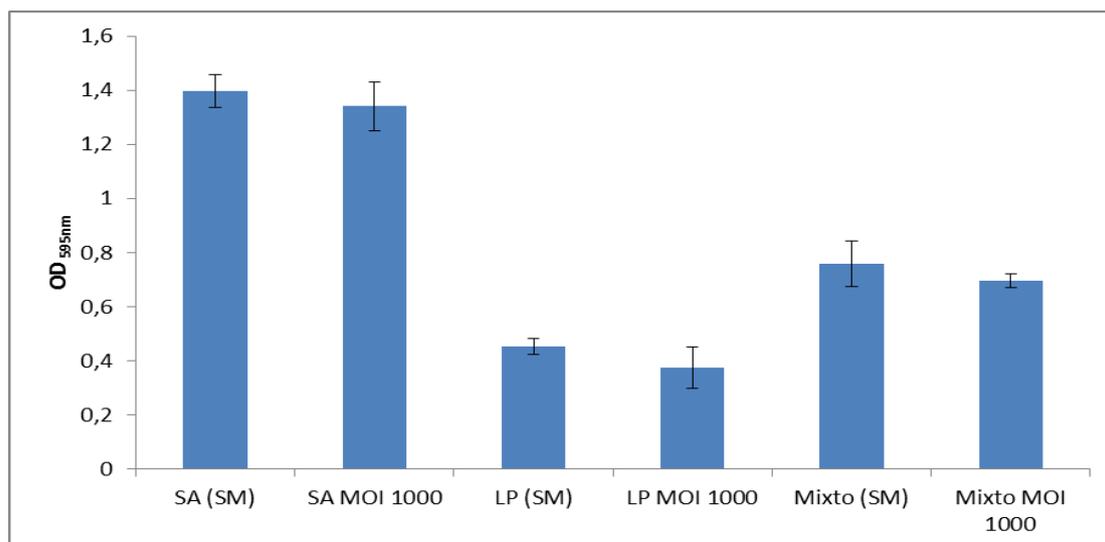


Figura 27. Biomasa total de biofilms de *S. aureus* RN 450 y *L. plantarum* 55-1 de 5 horas, tratados 4 horas con ϕ IPLA-RODI (MOI 1.000)

El tratamiento de biofilms con el bacteriófago (MOI 1000) no dio lugar a una disminución notable de la biomasa de biofilms de *S. aureus* individual y mixto.

Sin embargo, sí se observó un efecto drástico sobre el recuento de células viables de *S. aureus* tanto en biofilms monoespecie como mixtos, las cuales estaban por debajo del límite de detección (10 UFC/pocillo). Por otro lado, *L. plantarum* sufrió una ligera reducción de la viabilidad (Figura 28).

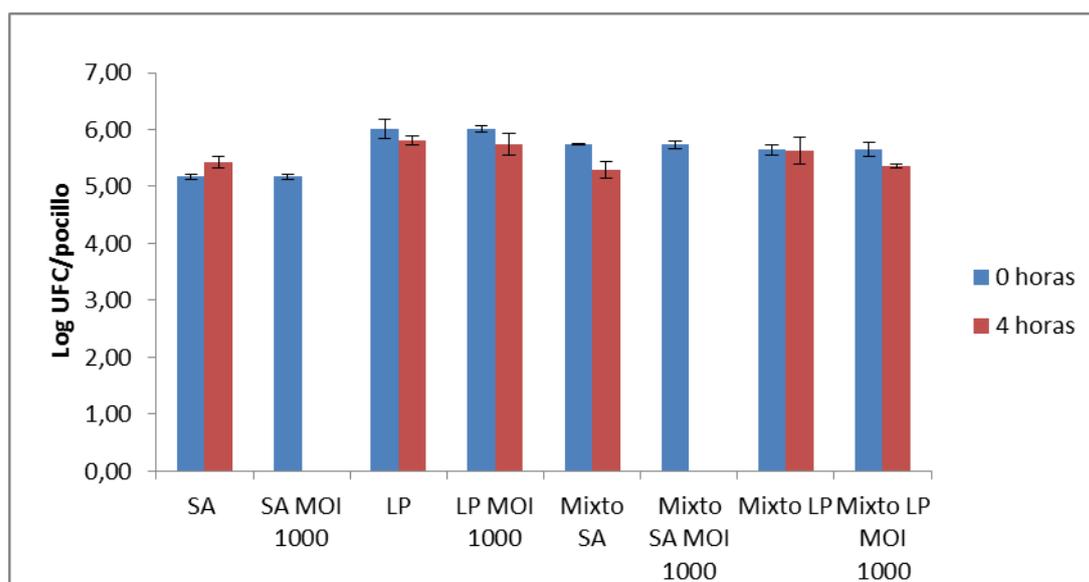


Figura 28. Evolución de células viables adheridas de *S. aureus* RN 450 y *L. plantarum* 55-1 a biofilms preformados de 5 h tras el tratamiento con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI (MOIs 1000) durante 4 h.

Resultados y discusión

Estos últimos resultados abren la posibilidad al uso del bacteriófago ϕ IPLA-RODI en las superficies de la industria alimentaria para combatir biofilms mixtos de *S. aureus*. No obstante, parece necesario desarrollar estrategias complementarias que permitan eliminar totalmente los restos de biomasa, que estaría constituida fundamentalmente por la matriz polimérica.

CONCLUSIONES

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. Las condiciones más adecuadas para el crecimiento de biofilms mixtos de *S. aureus* RN.450 y *L. plantarum* 55-1 en ambiente de laboratorio son las siguientes: temperatura de 32°C y medio de cultivo TSB + 0,25% de glucosa.
2. En las condiciones de cultivo señaladas, la tasa de crecimiento de cultivos planctónicos de *L. plantarum* es menor (0,54 vs. 0,58 h⁻¹; 0,39 vs. 0,54 h⁻¹) que la de *S. aureus*, y el tiempo de generación mayor (1,82 vs. 1,71 h; 2,52 vs. 1,35 h), con los dos inóculos utilizados.
3. Los biofilms mixtos de *S. aureus* y *L. plantarum* presentan un número de bacterias viables de *S. aureus* que es equivalente al de los biofilms monoespecie de esta bacteria, mientras que el número de bacterias viables de *L. plantarum* es un orden de magnitud inferior.
4. En términos de biomasa total se encontró que los biofilms monoespecie de *L. plantarum* producen más biomasa que los correspondientes a *S. aureus*.
5. El tiempo adecuado de tratamiento de biofilms de 5 h con el bacteriófago ϕ IPLA-RODI es de 4 horas cuando se utiliza una MOI de 1000, momento en el que se observó una eliminación total de células viables de *S. aureus* tanto en el biofilm monoespecie como en el biofilm mixto. Tratamientos con MOIs y tiempos inferiores a estos no dieron lugar a reducciones notables en el número de viables de los biofilms tratados. Con respecto a la biomasa, no se observaron cambios apreciables con ninguno de los tratamientos fágicos aplicados (MOI; 10, 100, 1000).

ABREVIATURAS

Abreviaturas

6. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BES: Boletín epidemiológico semanal

BP: Agar baird parker

BPM: Buenas prácticas de manufactura

DO: Densidad óptica (nm: nanómetros)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: Autoridad Europea de seguridad alimentaria

EPS: Sustancias poliméricas extracelulares

ETA: Enfermedad transmitida por los alimentos

h: Horas

HACCPs o APPCCs: Análisis de Peligros y puntos críticos de control

I+D: Investigación y desarrollo

IPLA: Instituto de productos lácteos de Asturias

ISCIII: Instituto de salud Carlos III

LTSEM: Microscopía electrónica de barrido de baja temperatura

MOI: Multiplicidad de infección

MRS: Caldo de peptona y glucosa

o/n: “overnight”; cultivos crecidos toda la noche (18 horas)

PBS: Tampón o buffer fosfato salino

PCR-DGGE: Reacción en cadena de la polimerasa-electroforesis desnaturalizante en gel de gradiente

Abreviaturas

PEG 8000: Polietilenglicol

PIA: Polisacárido de adhesión intercelular

s: Segundos

SE: Enterotoxina estafilocócica

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SIM: Sistema de información microbiológica

TSA: Agar tripticasa de soja o agar triptona de soja

TSB: Caldo de triptona y soja

TSST-1: Toxina shock tóxico

UFC: Unidades formadoras de colonia

UFP: Unidades formadoras de placas

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ackermann, H.W. (2009). Phage classification and characterization. *Met. Mol. Biol.*, 501, 127-140.
2. Argudín, M.A., Mendoza, M.C. y Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2 (7), 1751-1773.
3. Augusto, D. (2011). *La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos*. Tesis Doctoral. Departamento de genética y de microbiología. Bellaterra (Barcelona). <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/84011/das1de1.pdf?sequence=1>
4. Azeredo, J. y Sutherland, I.W. (2008). The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9, 261-266.
5. Aznar R, Chenoll E. 2006. Intraspecific diversity of *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, and *Leuconostoc mesenteroides* associated with vacuum-packed meat product spoilage analyzed by randomly amplified polymorphic DNA PCR. *J. Food Prot.* 69 (10):2403-10.
6. Bustos, J.A., Hamdan, A. y Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*, 17, 287-305.
7. Caso, J.L., (2015). Alteraciones y enfermedades microbianas asociadas a los alimentos. Máster en biotecnología alimentaria. Universidad de Oviedo. Consultado el 31.03.2015, de <https://www.campusvirtual.uniovi.es/course/view.php?id=3854>
8. Cermeño, M. (2012). *Estudio de las propiedades de interés probiótico y tecnológico de dos cepas de Lactobacillus plantarum*. Trabajo fin de máster. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria. Zaragoza. Consultado el 18.04.2015, de <http://invenio2.unizar.es/record/8544/files/TAZ-TFM-2012-580.pdf>
9. Cervantes, E., García, R. y Salazar, P.M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Patología clínica y medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40. Consultado el 04.04.2015, de <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
10. Coates A., y Hu Y. (2007). Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, 152, 1147-1154.

11. de la Fuente, N.M., y Barboza, J. E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*. Universidad de Guanajuato. México. 20 (1), 43-52.
12. Domínguez, L., Badiola, J.J., Cepeda, A., Más, A., Rodríguez, E., Zurera, G. y Téllez, S. (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. *Revista del comité científico*. (12), 1-25. Consultado el 20.05.2015, de http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/comite_cientifico/BIOFILMS.pdf
13. EFSA. (2009). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from European Commission on the use and mode of action of bacteriophages in food production. *The EFSA Journal*, 1076, 1-26.
14. EFSA, ECDC. (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA journal*, 12(2), 3547.
15. Elika. (2013). *Staphylococcus aureus*. Consultado el 18.04.2015, de http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/documento95/7.staphylococcus.pdf
16. Flemming, H. C. y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8, 623-633.
17. García, P., Martínez, B., Obeso, J.M. y Rodríguez, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47, 479-485.
18. García, P., Martínez, B., Rodríguez, L. y Rodríguez, A. (2011). Bacteriophages and Phage-Encoded Proteins: Prospects in Food Quality and Safety. *Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality*, 10-26.
19. García, P., Martínez, B., Rodríguez, L. Gutiérrez, D. y Rodríguez, A. (2012). Bacteriophages as biocontrol agents dairy processing. *Nova Science Publishers*. 1-25.
20. Götz, F. (2002). Staphylococcal and biofilms. *Mol. Microbiol.*, 43(6), 1367-1378.
21. Gutiérrez, D. (2010). Evaluación de la técnica RAPD-PCR para el estudio de la diversidad genética de bacteriófagos. Proyecto fin de máster. Universidad de Oviedo. Asturias.

22. Gutiérrez, D., Delgado, S., Vázquez-Sánchez, D., Martínez, B., López Cabo, M., Rodríguez, A., J. Herrera, J. y García, P. (2012). Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (24), 8547-8554.
23. Gutiérrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A. y García, P. (2014). Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PloS ONE*, 9(9), 1-9.
24. Gutiérrez, D., Vandenheuvel, D., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R y García, P. (2015). Two phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono- and dual- staphylococcal biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:3 336-3348.
25. Guttman, B., Raya, R. y Kutten, E. (2005). Bacteriophages: Biology and Applications. *CRC Press*, 29-66. Florida, EE.UU
26. Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L. y Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*, 36(4), 815-836.
27. Hermoso, S. y Offerhaus, M.L. (2009). Bacteriófagos: nueva Arma para la seguridad Alimentaria. Consultado el 28.05.2015, de http://alimentariaonline.com/PaDs9lu5/wp-content/uploads/MLC030_fagos.pdf
28. Hernández, R., Jiménez, Z. y Pla, R. (2011). Aplicación de bacteriófagos en alimentos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 12 (3). Consultado el 22.05.2015, de <http://www.respyn.uanl.mx/xii/3/ensayo/ensayo.htm>
29. Holah, J.T., Taylor, J.H., Dawson, D. J. y Hall, K.E. (2002). Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J. Appl Microbiol*, 92, 111s-120s.
30. Hosseinidoust, Z., Tufenkji, N. y van de Ven, T. G. M. (2013). Formation of biofilms under phage predation: considerations concerning a biofilm increase. *Biofouling*, 29 (4), 457-468.
31. Hudson, J.A. McIntyre, L., Billington, C., Sabour, P. y Griffiths, M. (2010). Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens: Application of bacteriophages in control of pathogenic and spoilage bacteria in food processing and distribution. *American Society for Microbiology*. Nueva Zelanda.
32. ISCIII. (2003). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (excluye hídricos). España. 1994-2003. Consultado el 18.05.2015, de

- <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-brotes/Informedebrotesalimentarios.pdf>
33. ISCIII. (2014). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2008-2011 (excluye brotes hídricos). Consultado el 16.06.2015, de <http://revista.isciii.es/bes/article/view/889/1069>
 34. Kraushaar, B. y Fetsch, A. (2014). First description of PVL-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wild boar meat. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 68-76.
 35. Kumar, C.G. y Anand, S.K., (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*, 42(1-2), 9-27.
 36. Lelieveld, H.L., Mostert, M.A. Holah, J. y White, B. (2003). Hygiene in food processing. *CRC Press LLC. Boca Raton FL., EE.UU.*
 37. Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 267-274
 38. Matsuzaki, S y Rashel, M. (2005). Bacteriophage therapy: revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect.and Chemother*, 11, 211-219.
 39. McDonell, G. y Russell, A. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12, 147-179.
 40. Mostert, M.A., Holah, J. y Lelieveld, H.L. (2005). Handbook of hygiene control in the food industry. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, Reino Unido*
 41. Nikolaev, Yu A. y Plakunov, VK. (2007). Biofilm--“City of microbes” or an analogue of multicellular organism? *Mikrobiologiya*, 76(2), 149-163.
 42. Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J. y Franklin, M.J. (2001). Role of alginate and its O-acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol.*, 183, 1047-1057.
 43. Novick, R. P. (1967). Properties of a cryptic high frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* 33, 155-166.
 44. Oliveira, K., Oliveira, T. Teixeira, P., Azeredo, J y Oliveira, R. (2007). Adhesion of *Salmonella enteritidis* to stainless Steel surfaces. *Brazilian J Microbiol*, 43, 93-100.
 45. Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 322, 207-228.

46. Piera, G. (2002). Estudio del biofilm: formación y consecuencias. Consultado el 05.06.2015, de http://www.adiveter.com/ftp_public/A1070308.pdf
47. Reij, M.W. y Den Aantrekker, E.D. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 1-11.
48. Ronda, C., Vázquez, M., y López, R. (2003). Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en acuicultura. *Revista AquaTIC*, 18, 3-10.
49. Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J. y Jiménez-Díaz, R. (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-Style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(6), 2059-2064.
50. Rusell, A.D. (2004). Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J. Hosp. Infect.* 57, 97-104
51. Scott, E. (2000). Relationship between cross-contamination and the transmission of foodborne pathogens in the home. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, S111-S113.
52. Segundo, A., Hernández, B. E., López, V.O. y Torres, A.O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 17-26.
53. Seija, V. (2008). Etiopatogenia microbiológica. Sección III. Consultado el 21.05.2015, de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
54. Sharma, M., Ryu, J.H. y Beuchat, L. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *J Appl Microbiol*, 99, 449-459.
55. Skinner, D., Keefer, C.S. (1941). Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med*, 68, 851-857.
56. Stephenson, H. (2012). Crecimiento celular. En: Cálculo en biología molecular y biotecnología. 2ª Ed. Pp. 41-81. Elsevier España Ltd. ISBN: 978-84-8086-909-6.
57. Sulakvelidze, A., Alavidza, Z. y Morris, G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (3), 649-659
58. Tait, K., Skillman, L. y Sutherland, I. (2002). The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. *Biofouling*, 18, 305-311.

59. Van der Veen, S. y Abee, T. (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *Int. J. Food Microbiol*, 144, 421–431.
60. Vasconcellos, J.A. (2004). Quality assurance for the food industry: a practical approach. *CRC Press. Boca Raton FL, EE.UU.*
61. Velázquez-Meza, M.E. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud pública Méx.* 47(5), 381-387. Consultado el 29.05.2015, de http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S0036-36342005000500009&script=sci_arttext
62. Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, A., Pitts, B. y Stewart, P.S. (2004). Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (10), 6188-6196.
63. Wildbrett, G. (2000). Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Editorial *Acribia*. Zaragoza, España.
64. World Health Organization (WHO). (2013). Strategic plan for food safety. Including foodborne zoonoses 2013-2022. Consultado el 18.05.2015, de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/101542/1/9789241506281_eng.pdf?ua=1
65. Zhang, X, Wang, L., y Levänen, E. (2013). Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion. *RSC Advances.*, 3, 12003-12020.