

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA
ACTIVIDAD *ANTIBIOFILM* DE
DIFERENTES ACEROS
NANOESTRUCTURADOS, FRENTE A
BACTERIAS PATÓGENAS DE INTERÉS
AGROALIMENTARIO”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

PAULA PÉREZ ÁLVAREZ

JULIO, 2023



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecerles a Felipe Lombó, Ignacio Gutiérrez y Javier Fernández por depositar su confianza en mí para llevar a cabo este trabajo, por su paciencia y ayuda en todo momento. También agradecerles a mis compañeros de laboratorio Patrick y Juan por echarme siempre una mano.

Y por supuesto a mi familia, por apoyarme y animarme incluso cuando mi versión más negativa salía a la luz.

*“I am always doing what I cannot do yet,
in order to learn how to do it”*

~ Van Gogh

ÍNDICE

Resumen	4
Abstract.....	5
Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
Lista de abreviaturas	8
1 Introducción.....	9
2 Consideraciones teóricas	13
2.1 Patógenos de interés agroalimentario	13
2.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.1.4 <i>Candida parapsilosis</i>	15
2.1.5 <i>Salmonella enterica</i>	15
2.2 Antecedentes de recubrimientos en acero con poder antimicrobiano.....	16
2.3 Recubrimientos antimicrobianos en acero nanoestructurado	18
2.4 Métodos para la evaluación de la actividad <i>antibiofilm</i>	21
3 Material y métodos	24
3.1 Acero nanoestructurado con actividad <i>antibiofilm</i>	24
3.2 Cepas patógenas y condiciones de cultivo.....	24
3.3 Ensayos <i>antibiofilm</i>	25
3.4 Análisis estadístico	27
4 Resultados y discusión	28
4.1 Crecimiento de los microorganismos patógenos	28

4.2	Evaluación de la actividad <i>antibiofilm</i>	29
5	Conclusiones.....	38
	Bibliografía.....	39
	Material suplementario	47

RESUMEN

Los *biofilms* son comunidades complejas de microorganismos, formadas por una o múltiples especies microbianas, embebidas en una matriz exopolisacáridica, con capacidad de adherirse tanto a superficies vivas como inertes. Son uno de los principales problemas en la industria alimentaria, ya que su formación supone una estrategia adaptativa que aumenta sus posibilidades de supervivencia, colonización y, por consiguiente, de contaminación alimentaria. El entorno de procesado de la industria alimentaria cuenta con múltiples superficies que favorecen el desarrollo de *biofilms*, pudiendo inducir daños en los equipos, contaminación de los alimentos y originar brotes alimentarios en la población. Algunas de las técnicas actuales para controlar su formación son el uso de tratamientos químicos, la disrupción enzimática, biosurfactantes, recubrimientos de acero, bacteriófagos, bacteriocinas, inhibición de la detección del *Quorum sensing* o aceites esenciales. Muchas de estas técnicas son ineficaces, costosas, complejas de llevar a cabo o no se plantean como una solución razonable para su uso a nivel industrial. El uso de materiales metálicos que eviten la formación de dichos *biofilms* es una alternativa prometedora y viable para su utilización en una cadena de producción. El objetivo principal de este trabajo ha sido el análisis de la capacidad *antibiofilm* de piezas metálicas nanoestructuradas con diferentes recubrimientos. Para ello se realizaron ensayos frente a 8 cepas bacterianas de amplio espectro (Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras) creciéndolas por triplicado sobre recubrimientos metálicos (Ag, SiO₂, ZnO, SiO₂ + Ag y ZnO + Ag) para posteriormente detectar y cuantificar las células vivas del *biofilm* mediante el cálculo indirecto de los niveles de ATP por luminiscencia. Los resultados muestran un efecto inhibitorio destacable de los recubrimientos formados por SiO₂ y ZnO, especialmente en su combinación con Ag, en las especies bacterianas *S. aureus*, *S. entérica* y *P. aeruginosa*. Se ha podido comprobar que los recubrimientos de nanomateriales metálicos son una posibilidad relevante a tener en cuenta en la industria agroalimentaria, aunque sería necesario realizar un estudio con un mayor número de muestras que permitiesen aumentar la potencia estadística del estudio para verificar su actividad *antibiofilm*.

ABSTRACT

Biofilms are complex communities of microorganisms, formed by one or multiple microbial species, embedded in an exopolysaccharide matrix, with the capacity to adhere to both living and inert surfaces. They are one of the main problems in the food industry, since their formation is an adaptive strategy that increases their chances of survival, colonization and, the consequently food contamination. The processing environment of the food industry has multiple surfaces that support the development of biofilms, which can cause damage to equipment, food contamination and food outbreaks in the population. Some of the current techniques to control their formation are the use of chemical treatments, enzymatic disruption, biosurfactants, steel coatings, bacteriophages, bacteriocins, inhibition of quorum sensing or essential oils. Many of these techniques are ineffective, expensive, complex to perform or are not a reasonable solution for its use in the food industry. The use of steel coatings which help to prevent the formation of such biofilms is a promising and viable alternative as an antibacterial technique in a production line. The main objective of this study was the analysis of the antibiofilm capacity of nanostructured metal squares with different coatings. For this purpose, tests were carried out against 8 broad-spectrum bacterial strains (Gram-positive, Gram-negative and yeasts) growing them in triplicate on metallic coatings (Ag, SiO₂, ZnO, SiO₂ + Ag and ZnO + Ag) to subsequently detect and quantify the live cells of the biofilm by indirect calculation of ATP levels by luminescence. The results show a remarkable inhibitory effect of the coatings formed by SiO₂ and ZnO, especially in combination with Ag, on the bacterial species *S. aureus*, *S. enterica* and *P. aeruginosa*. It has been shown that metallic nanomaterial coatings are a relevant possibility to be taken into account in the agri-food industry, although it would be necessary to carry out a study with a larger number of samples to verify their antibiofilm activity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del proceso de formación de un <i>biofilm</i> (Mahamuni-Badiger et al., 2020).	10
Figura 2. Ilustración esquemática del procedimiento de nanoestructuración y de los diferentes recubrimientos realizados en las piezas de acero inoxidable de grado alimenticio 316L. (González et al., 2021).	19
Figura 3. Micrografías tomados mediante microscopía electrónica de barrido de la superficie de las piezas a) sin tratamiento, b) con tratamiento de electropulido, c) con recubrimiento de nanopartículas de Ag, d) recubrimiento de película de Ag, e) recubrimiento de película TiO ₂ y f) recubrimiento de película de TiO ₂ y nanopartículas de Ag. (González et al., 2021).	20
Figura 4. Representación gráfica del porcentaje medio de formación de <i>biofilm</i> de las 8 especies patógenas en los 6 tipos diferentes de piezas metálicas.	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de absorbancia (OD ₆₀₀) y UFCs/mL de los microorganismos patógenos.	29
Tabla 2. Valores del porcentaje medio de crecimiento para cada microorganismo y recubrimiento.	30
Tabla 3. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de <i>S. aureus</i> .	32
Tabla 4. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de <i>C. parapsilosis</i> .	32
Tabla 5. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de <i>L. monocytogenes</i> .	33
Tabla 6. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de <i>P. aeruginosa</i> .	33
Tabla 7. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de <i>S. enterica</i> CECT443.	34
Tabla 8. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de <i>S. enterica</i> CECT554.	34
Tabla 9. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de <i>S. enterica</i> CECT556.	35
Tabla 10. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de <i>S. enterica</i> CECT698.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AESAN:** Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **SARM:** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina
- **MHC:** complejo principal de histocompatibilidad
- **APTES:** (3-aminopropil)triethoxisilano
- **TEOS:** ortosilicato de tetraetilo
- **AA:** ácido acrílico
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno
- **TTIP:** tetraisopropóxido de titanio
- **CMI:** concentración mínima inhibitoria
- **UFC:** unidades formadoras de colonias
- **ATP:** adenosín trifosfato
- **OD₆₀₀:** densidad óptica a 600 nm
- **TSA:** *Tryptic Soy Agar*
- **TSB:** *Tryptic Soy Broth*
- **PBS:** *Phosphate-buffered saline*
- **RLU:** *Relative Light Units*
- **SDS:** *Sodium Dodecyl Sulfate*
- **ANOVA:** *analysis of variance*
- **SEM:** error estándar

1 INTRODUCCIÓN

La incidencia de los brotes causados por contaminación bacteriana en alimentos continúa siendo una problemática de gran relevancia en la actualidad. La evidencia acumulada en los últimos tiempos pone de manifiesto que es un hecho que ocurre con mayor frecuencia de la deseada. Según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en los últimos meses se ha alertado de numerosas contaminaciones microbiológicas en alimentos presentes en la cadena de consumo, como por ejemplo, la presencia de *Clostridium perfringens* en canela molida, el género *Salmonella* en chistorra y hamburguesas, la toxina estafilocócica producida por *Staphylococcus aureus* en *Mozzarella* fresca, además de una gran variedad de alertas por la presencia de *Listeria monocytogenes* en carnes como cecina, morcilla o cabeza de cerdo (AESAN, 2023).

Uno de los principales responsables de la contaminación de alimentos a nivel industrial es la formación de *biofilms*, su formación por parte de diferentes microorganismos supone una estrategia adaptativa, que permite aumentar sus posibilidades de supervivencia, colonización y por consiguiente de contaminación alimentaria. Los *biofilms* se definen como comunidades complejas de microorganismos embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida, que pueden adherirse tanto a superficies vivas como inertes y pueden ser formadas por una o por múltiples especies microbianas (AESAN, 2010). La matriz que conforma los *biofilms* es una sustancia polimérica extracelular que se compone de uno o más polisacáridos, ADN y proteínas. Los exopolisacáridos se sintetizan dentro o fuera de las células y se secretan al exterior funcionando como andamio para la adhesión de nuevos componentes como carbohidratos, lípidos o proteínas (Rabin et al., 2015).

El proceso de formación de un *biofilm* se puede resumir en cinco etapas principales (Figura 1): (I) adhesión, los microorganismos se unen de forma reversible a una superficie mediante interacciones débiles (fuerzas de van der Waals); (II) colonización, la adhesión pasa a ser irreversible al crearse una unión más fuerte en la que pueden intervenir estructuras celulares como flagelos, *pili* o lipopolisacáridos; (III) desarrollo, las células proliferan formando capas a la vez que producen y secretan la matriz polimérica; (IV) maduración, se forma una comunidad tridimensional estable con canales para la distribución eficiente de nutrientes y moléculas de señalización en el interior del *biofilm*;

y por último (V) la dispersión activa, las células se separan y se diseminan formando colonias en otros lugares (Yin et al., 2019).

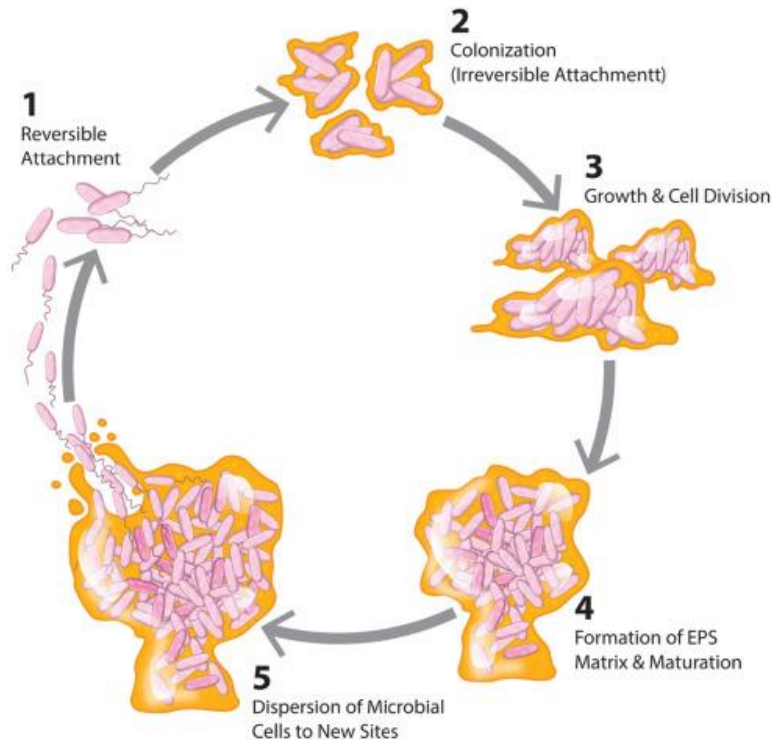


Figura 1. Representación esquemática del proceso de formación de un biofilm (Mahamuni-Badiger et al., 2020).

En la industria alimentaria, la formación de *biofilms* puede ser responsable de múltiples problemas como pueden ser daños en los equipos, contaminación de alimentos y origen de brotes infecciosos. El entorno de procesado de la industria cuenta con múltiples superficies que actúan como sustrato para muchos patógenos, lo cual unido a la complejidad de las plantas de producción, los largos periodos de fabricación y la elaboración masiva de productos favorece el desarrollo de *biofilms* (Carrascosa et al., 2021).

Los *biofilms* pueden estar conformados por una o más especies y, aunque generalmente los estudios relacionados con la formación de *biofilm* se centran en una única especie, es importante tener en cuenta que, en realidad, lo más frecuente sea que estén constituidos por múltiples especies. Las interacciones entre comunidades complejas de

microorganismos permiten una mayor resistencia ante desinfectantes y por tanto una mayor persistencia en las superficies de contacto con alimentos (Yuan et al., 2020).

Algunas de las especies que constituyen los *biofilms*, en el entorno de la industria alimentaria, son patógenos humanos que pueden producir y secretar toxinas que contaminan alimentos provocando finalmente intoxicaciones. Además, muchas de estas especies pueden tener variaciones genómicas en los genes clave implicados en la formación del *biofilm* lo que afecta y dificulta la erradicación de los mismos (Galié et al., 2018).

La formación de diversos tipos de *biofilm* conlleva la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para poder enfrentarse a ellos, más aún, cuando uno de los principales problemas al tratarlos es el desarrollo de resistencias a desinfectantes.

Por otro lado, no todos los microorganismos pueden ser detectados mediante métodos clásicos de cultivo, por ejemplo *L. monocytogenes* puede presentarse de forma viable pero no cultivable, en este caso sería necesario realizar una amplificación por técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para su detección (Galié et al., 2018).

Algunas de las estrategias más importantes para controlar la formación de *biofilms* en la industria alimentaria son el uso de tratamientos químicos, como desinfectantes con cloro; la disrupción enzimática, que ofrece una alternativa biodegradable y con baja toxicidad; biosurfactantes, que alteran la capacidad de unión y las propiedades de adhesión bacterianas; recubrimientos de acero, que presentan propiedades antimicrobianas y no producen resistencias; bacteriófagos, los cuales destruyen específicamente células procariontas; bacteriocinas, como la nisina; u otros como la inhibición de la detección del *Quorum sensing* o los aceites esenciales derivados de plantas con propiedades *antibiofilm* (Galié et al., 2018).

Una de las alternativas más prometedoras y que será investigada en mayor profundidad en este trabajo, son los recubrimientos de acero, que permiten prevenir la formación de *biofilms*, con diversas estrategias a nivel molecular, en lugar de eliminarlos, lo cual reduce la posibilidad del desarrollo de resistencias.

El objetivo principal de este estudio es la caracterización de la capacidad *antibiofilm* de diferentes recubrimientos metálicos nanoestructurados y de sus combinaciones frente a diversos patógenos de amplio espectro (Gram-positivos, Gram-negativos y hongos) con gran repercusión en el sector agroalimentario.

2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1 Patógenos de interés agroalimentario

Las especies utilizadas durante este ensayo son patógenas de importancia en el sector agroalimentario con capacidad de formación de *biofilms*. A continuación, se describen los microorganismos utilizados con sus principales características.

2.1.1 *Listeria monocytogenes*

La bacteria Gram-positiva *L. monocytogenes* es un patógeno que se transmite mediante la ingesta de alimentos, siendo su distribución ubicua, ya que se puede encontrar en suelos, alimentos o agua. Una de las principales complicaciones que puede causar son abortos en mujeres embarazadas, además de otras consecuencias adversas de gran gravedad en niños y ancianos, pudiendo desencadenar la muerte en este grupo de pacientes, mientras que en individuos sanos causaría diversos cuadros clínicos de gastroenteritis. Algunos alimentos como ensaladas envasadas, verduras, embutidos, huevos duros o derivados lácteos (quesos, helado, yogures) son conocidos por portar esta bacteria de forma habitual causando brotes de diversa magnitud (CDC, 2023).

Los *biofilms* producidos por *L. monocytogenes* se componen esencialmente por ácidos teicoicos, pudiendo desarrollarse sobre superficies de polipropileno como el de las tablas de cortar, acero inoxidable, caucho o vidrio, y de estos materiales propagarse a los alimentos sobre los que se pueden replicar incluso si se encontrasen a temperaturas de refrigeración (Silva et al., 2008). La erradicación de esta bacteria presenta complicaciones, ya que resiste temperaturas de hasta 60 °C, y la presencia de estructuras como *pili*, flagelos y proteínas de membrana que les aporta una buena capacidad de adhesión (Galié et al., 2018; Lemon et al., 2007).

2.1.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria anaerobia facultativa, Gram-positiva, inmóvil, no formadora de esporas y con capacidad de producir enterotoxinas a temperaturas de entre 10 y 46 °C. Esta bacteria puede multiplicarse sobre la piel y las membranas mucosas de los manipuladores de alimentos, por lo que es capaz de ocasionar graves problemas en la

industria de la alimentación (Giaouris et al., 2015); de hecho, se estima que más de un 30% de los manipuladores de alimentos son portadores asintomáticos de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) (Ahmed, 2020). *S. aureus* se multiplica en los alimentos secretando enterotoxinas termoestables, que al ingerirlas, se unen al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II en las células T, provocando su activación, que puede conllevar a un shock tóxico agudo con diarrea y vómitos (Schelin et al., 2017).

El desarrollo de *biofilms* por parte de *S. aureus* se ve beneficiado por distintos aspectos que se pueden encontrar en la industria alimentaria, como temperaturas subóptimas de crecimiento, una desinfección inadecuada o la combinación de concentraciones elevadas de sal y glucosa donde es capaz de crecer (Galié et al., 2018).

2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa se caracteriza por ser una bacteria Gram-negativa, aerobia, heterótrofa, móvil y con forma de bastón, que puede estar presente en una gran variedad de ambientes, como el aire, el agua, el suelo y diversos tejidos animales y vegetales. Es un patógeno humano oportunista que puede causar infecciones agudas y crónicas graves con diferentes manifestaciones clínicas, como meningitis, otitis, infecciones del tracto urinario y neumonía (Li et al., 2022).

El género *Pseudomonas* está constituido por microorganismos psicrófilos que pueden adaptarse y crecer a bajas temperaturas y bajo estrés oxidativo, pudiendo colonizar rápidamente alimentos refrigerados como lácteos o carnes provocando su deterioro, ya que producen pigmentos y enzimas proteolíticas y lipolíticas termotolerantes que reducen la calidad y vida útil de los alimentos proteicos (Quintieri et al., 2019; Radovanovic et al., 2020).

Entre los principales factores de virulencia de *P. aeruginosa* se incluyen los lipopolisacáridos, adhesinas, lectinas y flagelos, estos últimos junto con los *pili* tipo IV permiten la adhesión inicial para la formación del *biofilm*. Una de las mayores dificultades que acarrea el tratamiento de esta bacteria es su gran capacidad de adhesión a multitud de superficies y tejidos, además el uso excesivo de antibióticos las ha llevado a desarrollar múltiples resistencias, dificultando aún más su eliminación (Li et al., 2022).

2.1.4 *Candida parapsilosis*

La levadura *C. parapsilosis* se ha convertido en una de las especies fúngicas más críticas a nivel sanitario al causar infecciones en el torrente sanguíneo con especial gravedad en recién nacidos y en pacientes inmunocomprometidos, aunque también produce infecciones superficiales, del tracto urinario, de mucosa, sistémicas, endocarditis o meningitis (de J. Treviño-Rangel et al., 2012). La formación de *biofilms* en *C. parapsilosis* se basa en la generación de pseudohifas y en el cambio de los niveles de expresión de las adhesinas que se localizan en la pared celular (Gómez-Molero et al., 2021).

Aunque en ciertos casos la formación de *biofilms* de levaduras es deseable, como en la producción de alimentos fermentados, en el caso de la especie *Candida* se puede considerar un factor de virulencia, dado que confiere resistencia frente a terapias antifúngicas. Este microorganismo posee la capacidad de crecer sobre superficies de vidrio, polipropileno y tereftalato de polietileno; materiales usados comúnmente en el envasado alimentario (Rajkowska & Kunicka-Styczyńska, 2018).

Pese a que *C. parapsilosis* es considerada una levadura patógena oportunista, se ha explotado su uso en fermentaciones mixtas de cacao o café en conjunto con otros microorganismos, debido a su gran resistencia a condiciones estresantes como altas temperaturas o acidez y la producción de compuestos aromáticos activos de interés en dichos productos. No obstante, habría que tener en cuenta datos genómicos y ensayos clínicos para el uso seguro de *Candida* en la industria alimentaria (de Melo Pereira et al., 2022).

2.1.5 *Salmonella enterica*

S. enterica es una bacteria Gram-negativa, aerobia facultativa, flagelada y con forma bacilar que provoca cuadros de gastroenteritis o incluso septicemias en el caso de ciertos serovares (Carrascosa et al., 2021). Expresan fimbrias agregantes delgadas, también denominadas *curli*, que están presentes en la superficie celular y cumplen funciones importantes en los contactos célula a célula y en la colonización del huésped (Ćwiek et al., 2019).

S. enterica tiene la capacidad de adherirse con facilidad a matrices alimentarias como la carne, lo que puede llegar a desembocar en una contaminación cruzada entre diferentes lotes de alimentos, tanto en fábricas como en supermercados, siendo la carne de ave refrigerada uno de los productos que más problemas puede plantear (Wang et al., 2013).

2.2 Antecedentes de recubrimientos en acero con poder antimicrobiano

Uno de los primeros antecedentes encontrados sobre el uso de recubrimientos con capacidad antimicrobiana sobre acero data de 2002, en el cual se estudió su uso para disminuir la presencia de *S. aureus* en superficies de acero inoxidable mediante recubrimientos cerámicos de zeolita que contenían iones de plata y zinc, obteniéndose unos resultados prometedores en su reducción (Bright et al., 2002).

Un año después, otro ensayo puso a prueba de nuevo una matriz de zeolita con iones de plata y zinc como recubrimiento para acero inoxidable, en este caso se estudió la reducción en el crecimiento de *Escherichia coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes*, obteniendo unos resultados muy efectivos frente a *S. aureus* y *E. coli* (Cowan et al., 2003).

En la actualidad se sigue estudiando la incorporación de recubrimientos de zeolita con plata sobre acero inoxidable, llevando a cabo los ensayos mediante procesos más novedosos como la impresión 3D. En un ensayo, llevado a cabo en 2020, se crearon placas metálicas de acero inoxidable 316L mediante impresión 3D, se generó una superficie porosa mediante tecnología de fusión laser selectiva, y sobre estas placas porosas, se estableció el recubrimiento de zeolita, utilizando un método de cristalización hidrotermal *in situ*, al cual se le incorporaron los iones de plata por un proceso de intercambio aniónico. Los resultados de estos materiales mostraron una inhibición significativa frente a *S. aureus* y *E. coli* (Qing et al., 2020).

Otros tipos de recubrimientos utilizados en ensayos actuales están formados por (3-aminopropil)trióxido de silano (APTES), ortosilicato de tetraetil (TEOS) y ácido acrílico (AA). Se ha estudiado su actividad *antibiofilm* frente a *L. monocytogenes* y *E. coli*, obteniendo resultados positivos para *L. monocytogenes* al utilizar recubrimientos de dos

capas, una capa base de APTES y un recubrimiento funcional de TEOS o AA (Fernández-Gómez et al., 2022).

Una de las aproximaciones más prometedoras frente a la formación de *biofilms* es la del uso de nanomateriales, que permite prescindir de los aspectos desfavorables de los agentes químicos. El uso de nanopartículas como recubrimiento tiene como ventaja el aumento de la superficie, que permite crear un mayor número de sitios funcionales, además, los mecanismos de resistencia bacterianos no serían funcionales frente a nanopartículas, lo cual descarta la posibilidad de desarrollo de bacterias resistentes. Generalmente los nanomateriales actúan de dos formas frente a las bacterias, una mediante la interrupción del potencial e integridad de la membrana y por otro lado, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Beyth et al., 2015).

Existen nanopartículas de origen orgánico e inorgánico, sin embargo, las de origen orgánico, como pueden ser péptidos, compuestos de amonio cuaternario o compuestos de N-halamina, son considerados más inestables que los materiales inorgánicos, especialmente en el caso de su uso en procesos industriales en los que deban soportar condiciones extremas (temperatura, humedad, pH...). Esta es la razón por la cual se utilizan con mayor frecuencia materiales de naturaleza inorgánica. (Beyth et al., 2015).

Algunas de las nanopartículas inorgánicas más utilizadas son metales u óxidos metálicos, que se distinguen por su efecto antibacteriano. En este grupo se incluyen la plata (Ag), cuyo efecto ya ha sido reconocido desde la antigüedad para la desinfección de instrumentos médicos y la purificación de agua; óxido de hierro (Fe_3O_4), el cual muestra propiedades antiadherentes reduciendo el desarrollo tanto de Gram-positivas como de Gram-negativas; óxido de titanio (TiO_2), eficaz ante bacterias, diversas especies de virus y parásitos; óxido de zinc (ZnO), que tiene un bajo coste y es relativamente efectivo ante una amplia variedad de bacterias; y óxido de cobre (CuO), cuya eficacia se ha demostrado que es menor a la de la Ag o ZnO, por lo que habría que aumentar su concentración (Beyth et al., 2015).

2.3 Recubrimientos antimicrobianos en acero nanoestructurado

Las placas metálicas de acero nanoestructurado con recubrimientos antimicrobianos, usados durante el presente ensayo, fueron desarrolladas por el grupo de investigación MAGMATNANO (Magnetismo de Materiales y Nanomateriales) del Departamento de Física de la Universidad de Oviedo (González et al., 2021).

En la fabricación de las piezas metálicas, de acero inoxidable de grado alimentario 316L, se empleó un método electroquímico para crear la superficie nanoestructurada, compuesta por matrices autoordenadas de nanoagujeros. En primer lugar, sobre la superficie de la pieza se realizó un proceso de electropulido en baño electrolítico para la formación de los nanoagujeros, para ello se sumergieron las piezas en un baño compuesto de ácido perclórico, que permite obtener un pH bajo para promover la ionización de átomos metálicos en cationes metálicos, y éter de etilenglicol, que garantiza una alta viscosidad. Las condiciones de acidez y alta viscosidad permiten un mejor control en condiciones anódicas (González et al., 2021).

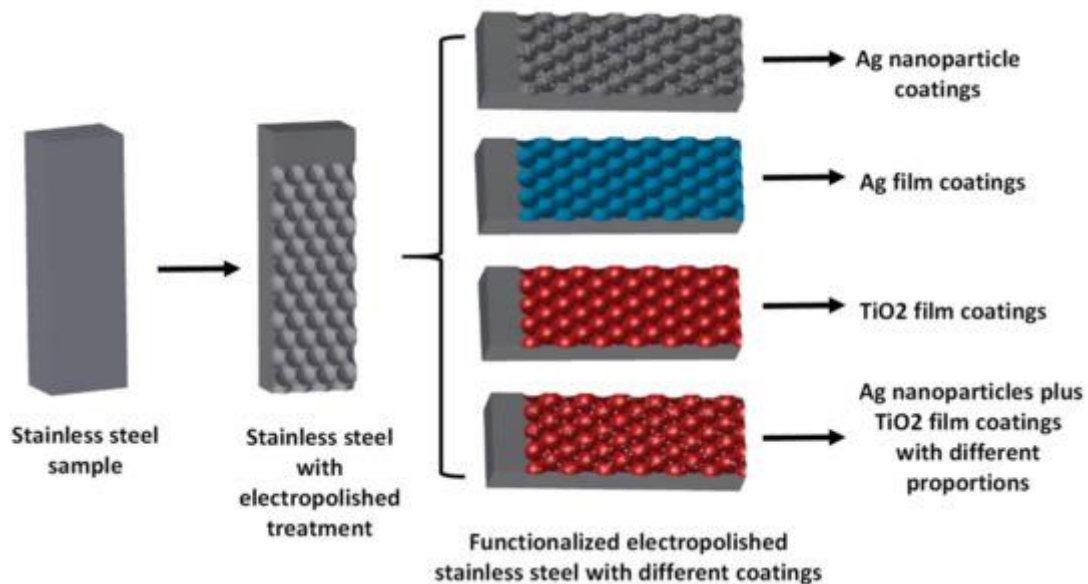


Figura 2. Ilustración esquemática del procedimiento de nanoestructuración y de los diferentes recubrimientos realizados en las piezas de acero inoxidable de grado alimenticio 316L. (González et al., 2021).

A continuación, se emplearon técnicas de funcionalización superficial y procesos fisico-químicos, con el fin de alterar la superficie mediante la aplicación de recubrimientos sobre los nanoagujeros. Los recubrimientos utilizados fueron nanopartículas de plata (Ag), películas de plata (Ag) y dióxido de titanio (TiO₂), cuya selección se debió a sus propiedades antimicrobianas y bactericidas (González et al., 2021). Las piezas obtenidas finalmente son de 4 tipos según el recubrimiento utilizado en la superficie nanoestructurada (Figura 2).

En el caso del recubrimiento de nanopartículas de plata, fueron depositadas en la superficie de las piezas mediante un método de deposición electrolítica, que permite obtener nanopartículas de plata por reducción de [Ag(NH₃)₂]⁺ con glucosa (González et al., 2021).

Para la creación de la película de plata se utilizó el proceso de electrodeposición que se llevó a cabo en una celda electroquímica de dos electrodos con un contraelectrodo de malla de platino (Pt) (González et al., 2021).

El recubrimiento de película de TiO₂ se realizó por deposición de capa atómica en un reactor ALD térmico Savannah 100 de *Cambridge Nanotech* (Waltham, MA, EE. UU.), utilizando tetraisopropóxido de titanio (TTIP) y agua como precursores y argón (Ar) como gas portador (González et al., 2021).

Como resultado de la nanoestructuración y de los distintos recubrimientos, en la Figura 3 se puede observar que la superficie de las piezas es diferente según el recubrimiento utilizado (Figura 3c-f), también se puede observar la pieza con la estructura original sin el tratamiento de electropulido (Figura 3a). Los nanoagujeros formados a partir del electropulido se disponen en una estructura autoordenada hexagonalmente, observándose claramente en la pieza que no tiene ningún recubrimiento (Figura 3b). En las Figuras 3c y 3d se observan las piezas con recubrimientos de Ag, en forma de nanopartículas o de película de Ag, estas micrografías tienen mayor definición debido a la mejor conductividad en presencia de Ag. Los recubrimientos de película de TiO₂ están presentes en las Figuras 3e y 3f, se observan las nanopartículas distribuidas por la superficie de forma homogénea (Figura 3e) y en forma de película de TiO₂ en combinación con

nanopartículas de Ag (Figura 3f), en este último caso se puede observar que la superficie de la pieza se encuentra totalmente cubierta (González et al., 2021).

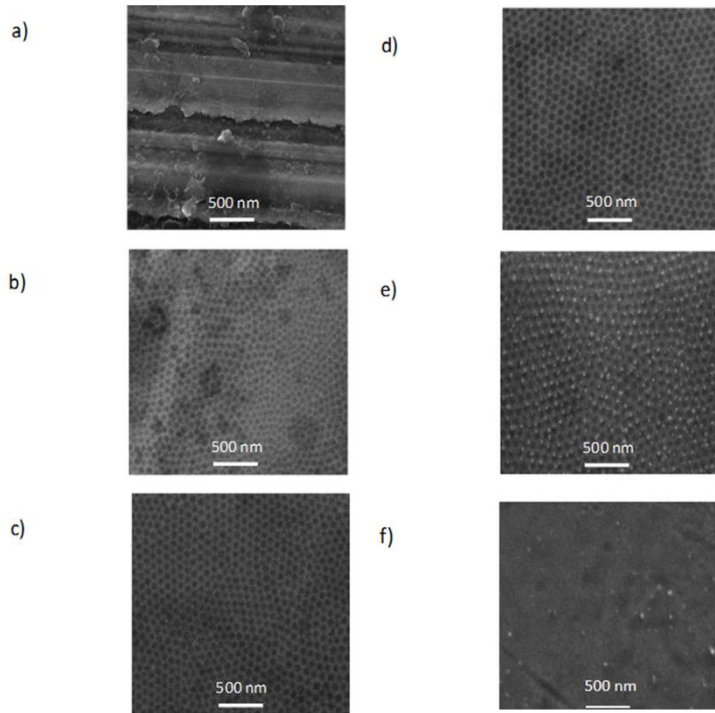


Figura 3. Micrografías tomados mediante microscopía electrónica de barrido de la superficie de las piezas a) sin tratamiento, b) con tratamiento de electropulido, c) con recubrimiento de nanopartículas de Ag, d) recubrimiento de película de Ag, e) recubrimiento de película TiO_2 y f) recubrimiento de película de TiO_2 y nanopartículas de Ag. (González et al., 2021).

El análisis de la composición química de las piezas indicó que el recubrimiento de TiO_2 mejora la adhesión de las nanopartículas de Ag sobre la superficie, estableciendo una capa de Ag continua y uniforme. También se llevaron a cabo análisis de estabilidad mediante pruebas de migración de nanopartículas, introduciendo las piezas en agua destilada durante un año para posteriormente determinar la concentración de iones en el agua. Los resultados mostraron que los iones de Ti tienen un potencial de migración más bajo en comparación con los de Ag, demostrando que los recubrimientos de TiO_2 son seguros para la salud humana. En contraste, los iones de Ag mostraron una migración más notoria, solo las piezas con $\text{TiO}_2 + \text{Ag}$ obtuvieron una menor migración, lo que lleva a la

conclusión de que, las películas de TiO_2 , actúan como agente fijador provocando un efecto beneficioso al reducir la migración de las nanopartículas de Ag. (González et al., 2021).

En el ensayo llevado a cabo por González y *col.*, se han realizado a su vez pruebas *antibiofilm* utilizando una especie fúngica, *C. parapsilosis*, y cinco especies bacterianas, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. Los resultados concluyeron que los recubrimientos para evitar la formación de *biofilm* fueron favorables, especialmente en el caso de las bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*) y en *E. coli*. Los recubrimientos combinados de TiO_2 + Ag obtuvieron resultados significativos para todos los tipos de *biofilms*, debido a que su combinación provoca la inactivación de proteínas y la muerte celular.

2.4 Métodos para la evaluación de la actividad *antibiofilm*

Los *biofilms*, a diferencia de las bacterias planctónicas, presentan una composición heterogénea y se ven influenciados notablemente por las condiciones ambientales. Por tanto, el número de células presentes en el interior de un *biofilm* no pueden cuantificarse de forma similar a las células bacterianas presentes en una suspensión homogénea, estas últimas pueden ser fácilmente calculadas mediante mediciones de densidad óptica (Haney et al., 2018). Actualmente, no hay un método estandarizado que permita evaluar la capacidad de inhibición o erradicación de nuevos compuestos *antibiofilm*, a diferencia de la evaluación de la capacidad antibacteriana en células planctónicas, que se puede llevar a cabo con métodos estandarizados como la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Haney et al., 2021).

La tinción con cristal violeta es uno de los métodos cuantitativos más utilizados para analizar la formación o inhibición de *biofilms* (Haney et al., 2018). De hecho, esta tinción es comúnmente conocida por ser el colorante utilizado en la tinción de Gram para diferenciar entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Beveridge, 2001). Es usada para el análisis de *biofilms* por su bajo coste y facilidad de uso. Permite estudiar el potencial inhibitorio de un compuesto cuantificando la biomasa adherida mediante la tinción y en el caso de ensayos de erradicación se debe de añadir una tinción metabólica que permita controlar la actividad metabólica del *biofilm* en presencia de antibióticos, péptidos de defensa del huésped u otros agentes *antibiofilm*. Debido a que la tinción de

crystal violeta tiñe los polisacáridos de la matriz extracelular, es incapaz de distinguir entre células vivas y muertas, por ello es necesario realizar la tinción metabólica, como medida del crecimiento y proliferación celular (Haney et al., 2021).

Otros métodos alternativos para el análisis de la actividad *antibiofilm* se basan en el marcaje de bacterias con fluorescencia, lo que requiere de cepas bacterianas manipuladas genéticamente, de sistemas microfluídicos, de la microscopía confocal de barrido láser de alto rendimiento o de sistemas comerciales como el *Biofilm Ring Test*, aunque estos últimos requerirían para su interpretación de equipos caros o especializados que no están al alcance de todos (Haney et al., 2021).

El método de *Calgary Biofilm Device* permite examinar la formación de *biofilms in vitro*. Se trata de una tapa de placa de microtitulación de 96 pocillos especializada con clavijas que están selladas en la parte superior para permitir su extracción sin abrir el recipiente, impidiendo de esta forma su contaminación. En el fondo de la placa hay un flujo constante de medio que permite el paso por todas las clavijas permitiendo la formación de biopelículas de las mismas características en todas las clavijas (Ceri et al., 1999). Este tipo de placa permite retirar el *biofilm* adherido y colocarlo en placas para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Aunque esta técnica ha demostrado buenos resultados en la evaluación de compuestos *antibiofilm*, no se puede considerar una técnica eficiente para un gran número de muestras, ya que requiere mucho tiempo y utiliza un gran número de recursos (Haney et al., 2021).

Las técnicas anteriores permiten evaluar la actividad *antibiofilm*, no obstante, presentan limitaciones, como equipos especializados y poco asequibles, técnicas en las que hay que invertir un tiempo considerable o un gran número de recursos. En el caso de la tinción de crystal violeta, aunque sea una técnica fácil y rápida, no permite diferenciar entre células vivas y muertas, en este caso podría usarse una tinción metabólica como las sales de tetrazolio, sin embargo, hay que tener en consideración que este tipo de tinción depende de las condiciones de crecimiento de las bacterias, pudiendo obtenerse resultados negativos en el caso de que las condiciones no sean óptimas. (Haney et al., 2021).

Una técnica que permite obtener resultados rápidos y cuantificar las bacterias viables durante los ensayos de formación de *biofilm* es el reactivo comercial BacTiter-Glo™,

desarrollado por Promega (BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay, Promega,). Este reactivo contiene enzimas encargadas de la lisis celular, así como, luciferina y luciferasa, que en presencia de adenosín trifosfato (ATP) liberado del interior celular induce la emisión de luz, que será cuantificada por un luminómetro. Esta medida de la luminiscencia será proporcional a la concentración de ATP, es decir, será proporcional al número de células bacterianas vivas presente en el *biofilm*, ya que solo las bacterias viables van a producir ATP. Además este método tiene una alta sensibilidad ya que permite la detección de niveles de ATP mediante fluorescencia producidos por tan sólo 10 células, siendo un método mucho más eficiente que los que utilizan una metodología basada en absorbancia (Junker & Clardy, 2007).

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Acero nanoestructurado con actividad *antibiofilm*

En el transcurso de este ensayo se han utilizado piezas de acero inoxidable 316L nanoestructurado con nanoagujeros realizados mediante la técnica de electropulido desarrolladas por el grupo de investigación MAGMATNANO del Departamento de Física de la Universidad de Oviedo (González et al., 2021). Se utilizaron 18 piezas de acero, de aproximadamente 8 mm de lado, de las cuales 15 estaban tratadas con recubrimientos de plata (Ag), óxido de zinc (ZnO), óxido de silicio (SiO₂), óxido de silicio combinado con plata (SiO₂ + Ag) y óxido de zinc combinado con plata (ZnO + Ag), teniendo en total tres réplicas de cada pieza tratada y otras tres piezas sin ningún recubrimiento que funcionarán como control positivo.

3.2 Cepas patógenas y condiciones de cultivo

Se han empleado diversas bacterias patógenas de interés agroalimentario, con niveles diferentes de formación de *biofilm*, para analizar la eficacia antibacteriana de las piezas metálicas, las bacterias patógenas utilizadas son las siguientes:

- *Listeria monocytogenes* CECT911
- *Staphylococcus aureus* CECT240
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853
- *Candida parapsilosis* SMI828
- *Salmonella enterica* CECT443
- *Salmonella enterica* CECT554
- *Salmonella enterica* CECT556
- *Salmonella enterica* CECT698

Con el fin de conservar las cepas del estudio se realizaron gliceroles. Para ello se partió de un cultivo en crecimiento exponencial en medio TSB (*Tryptic Soy Broth*; Merck, Madrid, España), se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y el sedimento bacteriano

se resuspendió en un criovial con glicerol al 25%, finalmente fueron conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

3.3 Ensayos *antibiofilm*

Para llevar a cabo el ensayo, en primer lugar, se cuantificaron los diferentes microorganismos. Para ello se midieron las absorbancias (OD_{600}) y se cuantificaron unidades formadoras de colonias (UFCs) en placas de medio TSA (*Tryptic Soy Agar*; Merck, Madrid, España) de cada una de las cepas, cultivadas durante una noche, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 250 rpm, para conocer la correlación entre la absorbancia y las UFCs del cultivo. Mediante esta correlación se podrá ajustar posteriormente, a partir de la medida de la absorbancia, el volumen requerido, por ensayo, para poder obtener unas UFCs finales de cada cepa de 5×10^5 UFCs/mL para las bacterias utilizadas en el estudio y de $2,5 \times 10^5$ UFCs/mL en el caso de *C. parapsilosis*.

Cada cepa bacteriana se pre-inoculó el día previo a su uso en el ensayo *antibiofilm*. Para ello se partió de 10 μL de un stock de glicerol 25% de la cepa que se inoculó en 5 mL de medio TSB y se incubó durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 250 rpm., incluyendo un control negativo únicamente con medio TSB.

Partiendo del cultivo de la cepa seleccionada en fase de crecimiento exponencial, se mide la OD_{600} y se diluye en medio TSB fresco y estéril, hasta alcanzar la concentración de 5×10^5 UFCs/mL para las bacterias utilizadas en el estudio y de $2,5 \times 10^5$ UFCs/mL en el caso de *C. parapsilosis*.

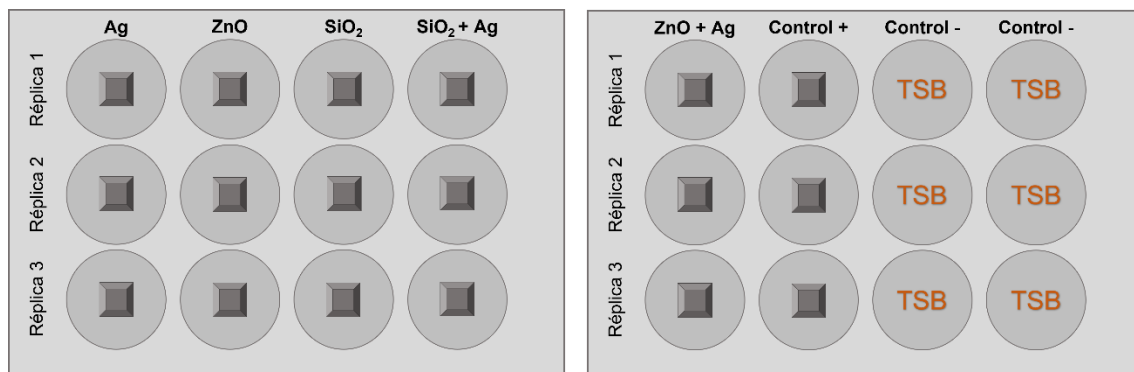


Figura 4. Esquema de la disposición de las piezas de acero nanoestructurado con sus diferentes recubrimientos en las placas de microtitulación de 12 pocillos.

En dos placas de microtitulación de 12 pocillos se disponen las piezas de acero colocando las tres réplicas de cada tratamiento en cada una de las columnas (Figura 4) y se añaden 3 mL de la suspensión bacteriana en cada pocillo. Se incluyen como control positivo las piezas sin recubrimiento, que representarán un 100% de adhesión bacteriana, y como control negativo se dejan los 6 pocillos restantes con 3 mL de TSB. Las placas se cubren con Parafilm® y se incuban durante 48 h a 37 °C y 115 rpm.

Pasadas 48 h se retira el medio de cultivo y se lava cada pocillo dos veces cuidadosamente con PBS (*Phosphate-buffered saline*) para eliminar las bacterias planctónicas que pudiesen permanecer en las piezas metálicas.

Una vez lavadas se dejan secar durante 10 minutos. Debido a la heterogeneidad del tamaño de las piezas metálicas es necesario delimitar una superficie uniforme de cuantificación en cada una de ellas, para ello se coloca sobre cada pieza un cilindro de 7 mm de diámetro y se añade en cada pocillo 3 mL de agarosa al 3 %, quedando únicamente expuesta la superficie de la pieza metálica delimitada por el interior del cilindro. Se deja secar hasta que la agarosa haya polimerizado lo suficiente para poder retirar los cilindros, pudiendo crear de esta forma, pocillos sobre la pieza metálica que permitan valorar la misma superficie de *biofilm* en todas las piezas.

En cada uno de estos nuevos pocillos se añaden 75 µL de PBS y 75 µL del reactivo BacTiter-Glo™ (*BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay*, Promega, Madrid, España) y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se recuperan 140 µL de cada pocillo y se añaden a placas opacas de 96 pocillos para proceder a medir la luminiscencia en el luminómetro (GloMax Multi, Promega, Madrid, España), del cual se obtendrán valores de RLU (*Relative Light Units*). El reactivo BacTiter-Glo™ permite determinar el número de células viables en el *biofilm* mediante la cuantificación del adenosín trifosfato (ATP) presente en las células, el reactivo facilita la extracción del ATP del interior de las células y promueve la reacción catalizada por la enzima luciferasa en presencia de luciferina, la luz generada será proporcional al número de células viables.

Por último, se deben lavar las piezas para poder utilizarlas posteriormente con otra cepa distinta. Con el fin de romper y disgregar los restos de *biofilm* se sumergen las piezas metálicas durante 5 minutos en NaOH 1 N, a continuación, se frotan en una solución de

SDS al 1% (*Sodium Dodecyl Sulfate*), se aclaran con agua destilada y se pasan a botes sumergiéndolas en agua destilada para autoclavarlas.

3.4 Análisis estadístico

Los datos representan el porcentaje de *biofilm* presente en cada placa metálica respecto al control absoluto (placas metálicas nanoestructuradas sin recubrimiento). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, concretamente con el modelo de Kruskal-Wallis de comparaciones múltiples y previo análisis de la normalidad mediante la prueba de *D'Agostino & Pearson test*.

La representación gráfica se realizó mediante el software *Graphpad V9* expresándose como la media y el error estándar (SEM) para cada valor, se consideraron los datos estadísticamente significativos cuando el p-valor de estos era menor de 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Crecimiento de los microorganismos patógenos

Los 8 microorganismos patógenos escogidos para la realización de este ensayo son: una especie fúngica (*C. parapsilosis* SMI828), dos especies bacterianas Gram-positivas (*L. monocytogenes* CECT911 y *S. aureus* CECT240) y dos especies bacterianas Gram-negativas (*P. aeruginosa* ATCC27853 y *S. enterica*), utilizando cuatro cepas diferentes en el caso de *S. enterica* (*S. enterica* CECT443, *S. enterica* CECT554, *S. enterica* CECT556 y *S. enterica* CECT698). Todas las especies son patógenas formadores de *biofilm* asociadas a la industria agroalimentaria.

El valor de la absorbancia y la determinación de las UFCs del cultivo en placa tras incubar las cepas durante una noche, cuyos valores se disponen en la Tabla 1, permitieron ajustar los cultivos a las UFCs finales requeridas de cada cepa para el ensayo *antibiofilm*.

Tabla 1. Valores de absorbancia (OD_{600}) y UFCs/mL de los microorganismos patógenos.

Cepa	Absorbancia (OD_{600})	UFCs/mL Cultivo
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 911	2,105	2,12E+13
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 240	3,334	7,53E+12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2,970	3,58E+12
<i>Candida parapsilosis</i> SMI 828	3,804	6,80E+09
<i>Salmonella enterica</i> CECT 443	2,202	6,50E+13
<i>Salmonella enterica</i> CECT 554	2,190	1,94E+14
<i>Salmonella enterica</i> CECT 556	2,361	3,72E+14
<i>Salmonella enterica</i> CECT 698	1,826	5,60E+14

4.2 Evaluación de la actividad *antibiofilm*

Los microorganismos patógenos se crecieron sobre 3 réplicas de las piezas metálicas con cada uno de los recubrimientos, según lo descrito en la Figura 4. Los resultados de la actividad metabólica de cada *biofilm* se registraron midiendo la luminiscencia producida por cada uno, la cual es proporcional al ATP producido por las células que forman el *biofilm*. Estos resultados se representan como el porcentaje de crecimiento del microorganismo sobre los diferentes nanomateriales, respecto a las piezas de control que no poseían ningún recubrimiento, y que servirán como referencia para detectar los niveles basales, es decir, el 100% de crecimiento. La media del porcentaje de crecimiento para cada microorganismo, en las 3 réplicas de cada pieza metálica, se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores del porcentaje medio de crecimiento para cada microorganismo y recubrimiento.

Recubrimiento	% Crecimiento							
	<i>S. aureus</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i> CECT443	<i>S. enterica</i> CECT554	<i>S. enterica</i> CECT556	<i>S. enterica</i> CECT698
Ag	76,40	71,66	86,11	55,72	20,77	72,40	35,69	72,38
ZnO	58,46	91,06	96,57	38,70	83,94	30,83	87,32	122,33
SiO ₂	46,04	76,93	85,49	64,67	133,27	43,95	143,14	98,18
SiO ₂ + Ag	44,80	66,53	125,85	35,07	23,19	27,21	85,48	65,45
ZnO + Ag	91,12	70,19	142,98	46,07	13,68	34,93	41,63	64,72

En el análisis estadístico se usó la prueba ANOVA para comparar los porcentajes de formación de *biofilm* de cada microorganismo entre las diferentes piezas metálicas. En este estudio solo se pudo disponer de 3 réplicas de cada tipo de nanomaterial, por lo que hubo una limitación de la potencia estadística, además, en ningún caso se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas y únicamente se podrá hablar de tendencias *antibiofilm* de ciertos materiales.

La Figura 5 representa de forma visual los datos establecidos en la Tabla 2, es decir, el efecto de cada recubrimiento sobre los microorganismos patógenos formadores de *biofilm*. Se observa una tendencia general en la reducción de la formación de *biofilm*, destacando el caso de *S. enterica* CECT554, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. En contraste, presentan una menor inhibición del crecimiento la especie fúngica *C. parapsilosis* y la especie bacteriana *L. monocytogenes*.

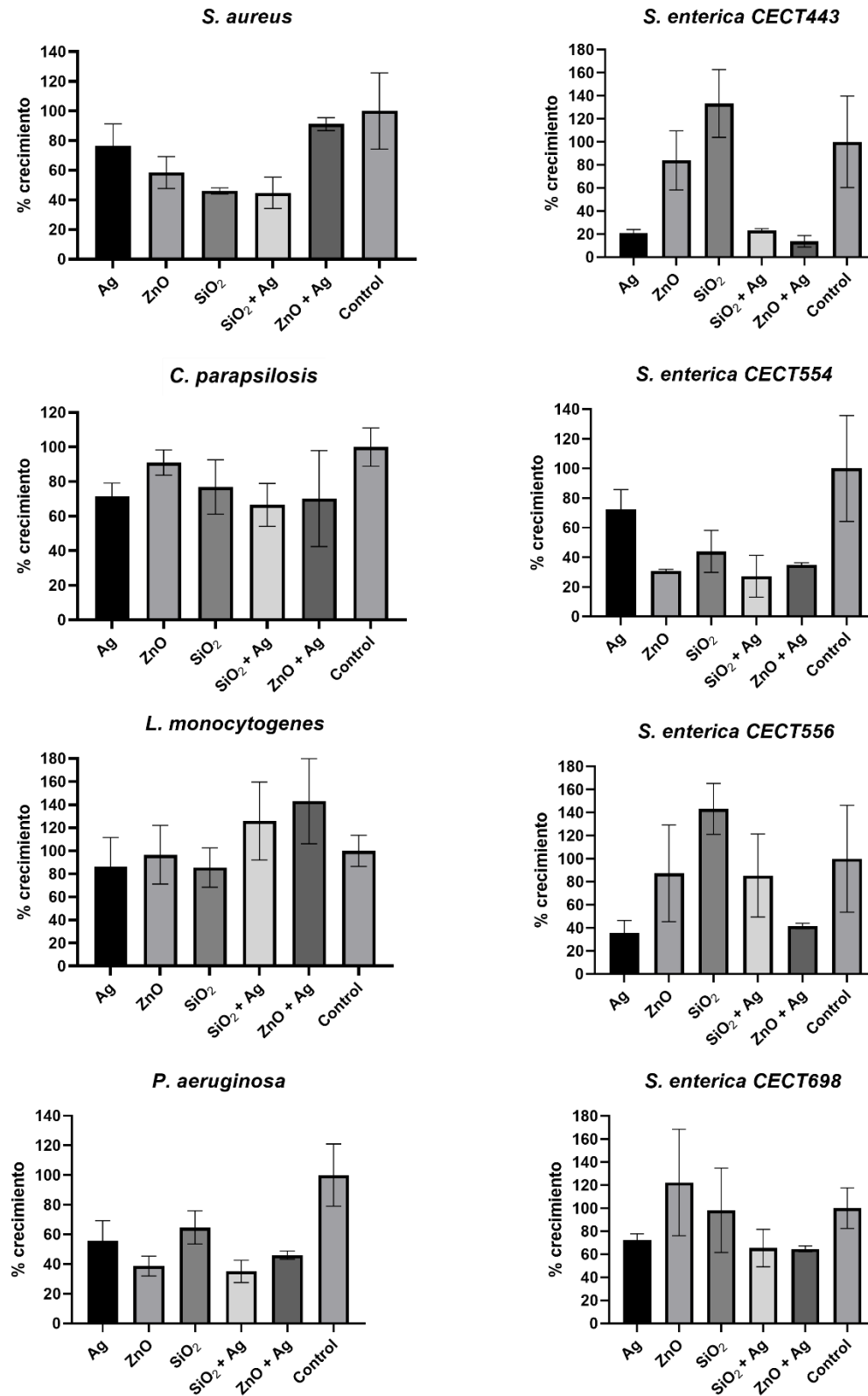


Figura 4. Representación gráfica del porcentaje medio de formación de biofilm de las 8 especies patógenas en los 6 tipos diferentes de piezas metálicas.

Tabla 3. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> CECT240			
	Promedio RLU	Porcentaje medio de crecimiento	Porcentaje medio de inhibición
Ag	634797,67	76%	24%
ZnO	485727,33	58%	42%
SiO ₂	382499,00	46%	54%
SiO ₂ + Ag	372235,00	45%	55%
ZnO + Ag	757102,33	91%	9%
Control +	830899,67	100%	0%
Control -	784,03		

Los resultados obtenidos en el caso de *S. aureus* (Tabla 3) muestran una tendencia inhibitoria en todos los recubrimientos. Siendo el recubrimiento de SiO₂ combinado con AG el que mayor inhibición del crecimiento produce (55%), seguido por el recubrimiento de SiO₂ en solitario (54% de inhibición). En el caso del ZnO combinado con Ag se observa una menor capacidad inhibitoria, presentando un porcentaje de crecimiento cercano al grupo de control.

Tabla 4. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de *C. parapsilosis*.

<i>C. parapsilosis</i> SMI828			
	Promedio RLU	Porcentaje medio de crecimiento	Porcentaje medio de inhibición
Ag	621552,00	72%	28%
ZnO	789814,00	91%	9%
SiO ₂	667324,00	77%	23%
SiO ₂ + Ag	577070,33	67%	33%
ZnO + Ag	608764,67	70%	30%
Control +	867383,33	100%	0%
Control -	2318,25		

En el caso de *C. parapsilosis* (Tabla 4), se observa una menor disminución del crecimiento en todos los casos, este comportamiento puede deberse al mayor tamaño de la levadura en comparación con el resto de las especies bacterianas, pues podrá presentar una mejor adherencia. Aun así, los recubrimientos que contienen Ag obtienen mejores resultados (28% de inhibición en Ag, 33% en SiO₂ y 30% en ZnO) que los que se componen únicamente de SiO₂ y ZnO (23% y 9% de inhibición respectivamente).

Tabla 5. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de *L. monocytogenes*.

<i>L. monocytogenes</i> CECT911			
	Promedio RLU	Porcentaje medio de crecimiento	Porcentaje medio de inhibición
Ag	139197,20	86%	14%
ZnO	156120,50	97%	3%
SiO ₂	138205,33	85%	15%
SiO ₂ + Ag	203452,70	126%	-26%
ZnO + Ag	231141,67	143%	-43%
Control +	161658,33	100%	0%
Control -	21,00		

Para *L. monocytogenes* (Tabla 5) los resultados no son tan prometedores, se observa una leve disminución del crecimiento en las piezas con recubrimientos de Ag y SiO₂ (14% y 15% de inhibición respectivamente), sin embargo, la combinación de ambos hace que pierda eficacia (126% de crecimiento), observándose una tendencia superior al control.

Tabla 6. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853			
	Promedio RLU	Porcentaje medio de crecimiento	Porcentaje medio de inhibición
Ag	205747,33	56%	44%
ZnO	142905,47	39%	61%
SiO ₂	238808,00	65%	35%
SiO ₂ + Ag	129514,40	35%	65%
ZnO + Ag	170095,00	46%	54%
Control +	369259,33	100%	0%
Control -	16,00		

En lo que respecta a *P. aeruginosa* (Tabla 6), las tendencias son bastante optimistas, se observa una mayor inhibición en la formación de *biofilm* en el caso del recubrimiento de ZnO (61% de inhibición) y en la combinación de SiO₂ + Ag (65% de inhibición). En cuanto a la combinación de ZnO + Ag (54% de inhibición), la tendencia muestra una mayor eficacia inhibidora en comparación con el uso exclusivo de Ag (44% de inhibición).

Tabla 7. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de *S. enterica* CECT443.

<i>S. enterica</i> CECT443			
	Promedio RLU	Porcentaje medio de crecimiento	Porcentaje medio de inhibición
Ag	12796,85	21%	79%
ZnO	51719,37	84%	16%
SiO ₂	82114,90	133%	-33%
SiO ₂ + Ag	14292,60	23%	77%
ZnO + Ag	8432,79	14%	86%
Control +	61612,73	100%	0%
Control -	23,00		

La cepa *S. enterica* CECT443 (Tabla 7) es la bacteria que muestra mejores resultados ante el uso de recubrimientos de Ag, tanto en solitario (79% de inhibición) como en combinación con SiO₂ y ZnO (77% y 86% de inhibición respectivamente) se muestra una tendencia muy favorable en la inhibición del crecimiento de la cepa. Por el contrario, los recubrimientos de ZnO y SiO₂ (84 y 133% de crecimiento respectivamente) muestran una tendencia mayor, incluso que el control, en el caso del SiO₂.

Tabla 8. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de *S. enterica* CECT554.

<i>S. enterica</i> CECT554			
	Promedio RLU	Porcentaje medio de crecimiento	Porcentaje medio de inhibición
Ag	21112,65	72%	28%
ZnO	8990,48	31%	69%
SiO ₂	12817,34	44%	56%
SiO ₂ + Ag	7935,22	27%	73%
ZnO + Ag	10185,89	35%	65%
Control +	29158,07	100%	0%
Control -	2388,27		

A diferencia de la cepa anterior, los recubrimientos de Ag inhiben el crecimiento de *S. enterica* CECT554 (Tabla 8) en menor medida (28% de inhibición) en comparación con el resto de los nanomateriales estudiados. El ZnO (69% de inhibición) y su combinación con Ag (65% de inhibición), así como, SiO₂ + Ag (73% de inhibición) son los que presentan una tendencia clara en la inhibición de este *biofilm*.

Tabla 9. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de *S. enterica* CECT556.

<i>S. enterica</i> CECT556			
	Promedio RLU	Porcentaje medio de crecimiento	Porcentaje medio de inhibición
Ag	13809,78	36%	64%
ZnO	33787,53	87%	13%
SiO ₂	55391,20	143%	-43%
SiO ₂ + Ag	33079,53	85%	15%
ZnO + Ag	16109,25	42%	58%
Control +	38696,30	100%	0%
Control -	28,00		

El uso de recubrimientos de SiO₂ (143% de crecimiento) promueven el crecimiento en el caso de *S. enterica* CECT556 (Tabla 9). La Ag, como en el caso de la cepa CECT443, muestra una tendencia favorable en la reducción de la formación de *biofilm* (64% de inhibición), al igual que su uso en combinación con ZnO (58% de inhibición) y SiO₂ (15% de inhibición), los cuales muestran una reducción destacable respecto a su uso por separado.

Tabla 10. Valores promedio de RLU y porcentaje medio de crecimiento e inhibición de *S. enterica* CECT698.

<i>S. enterica</i> CECT698			
	Promedio RLU	Porcentaje medio de crecimiento	Porcentaje medio de inhibición
Ag	130880,00	72%	28%
ZnO	221202,93	122%	-22%
SiO ₂	177517,77	98%	2%
SiO ₂ + Ag	118341,07	65%	35%
ZnO + Ag	117024,00	65%	35%
Control +	180817,00	100%	0%
Control -	39,00		

Por último, la cepa *S. enterica* CECT698 (Tabla 10) presenta similitudes con las cepas CECT443 y CECT556 en las tendencias inhibitorias, ya que, de la misma manera, se evidencia una disminución en el crecimiento en los recubrimientos que contienen Ag (28% de inhibición en el caso de Ag y 35% en las combinaciones) respecto a los formados por ZnO y SiO₂ que se mantienen en valores cercanos al control.

Las diferencias encontradas entre las cepas de *Salmonella* pueden deberse principalmente al grado de formación de *biofilm*, teniendo cepas con un grado fuerte de formación hasta un grado débil, por lo que el efecto de los recubrimientos puede verse afectado dando lugar a resultados opuestos entre cepas de la misma especie.

Las piezas metálicas revestidas de nanomateriales cuentan con una estructura de nanoporos que no tiene la pieza control. Los nanoporos generados en las piezas son de un tamaño menor que los microorganismos, por tanto sobre estas piezas las bacterias crecerán en contacto sobre una superficie menor que en la pieza de control, lo que conlleva a fuerzas de adhesión más débiles y a la supresión de los mecanismos frente a antibióticos (González et al., 2021). Esta pérdida de la adhesión conlleva, a que, de forma general, haya una menor formación de *biofilms* en las piezas nanoestructuradas con respecto a las piezas control.

El uso de recubrimientos de Ag muestra una tendencia inhibitoria en todas las especies patógenas con particular relevancia en las cepas de *S. enterica* CECT443, CECT556 y CECT698, también ha mostrado buenos resultados en *C. parapsilosis*, *L. monocytogenes* y en el caso de *P. aeruginosa* y *S. aureus* en combinación SiO₂. Las nanopartículas de Ag tienen un notable potencial como agente antimicrobiano, sus iones se unen a las paredes y membranas celulares de las bacterias inhibiendo los procesos de respiración celular (Rai et al., 2009). Estudios recientes reflejan la eficacia *antibiofilm* de recubrimientos monocapa de nanopartículas de Ag, especialmente frente a bacterias Gram-negativas (Yi et al., 2022). Se ha visto que bacterias Gram-negativas como *E. coli* presentaron un aumento significativo de la permeabilidad de su membrana en presencia de nanopartículas de plata, lo que resultó en la muerte de la célula (Sondi & Salopek-Sondi, 2004). Esto puede explicar por qué bacterias Gram-negativas como *S. enterica* presentan una notable inhibición de su crecimiento ante recubrimientos de Ag. Además de este mecanismo, los iones de Ag se unen a los grupos tiol característicos de proteínas bacterianas impidiendo su funcionalidad y causando la muerte celular y su replicación (Rai et al., 2009). Debido a sus múltiples mecanismos de acción dificulta enormemente la generación de resistencias a este tratamiento.

El SiO₂ también presentó tendencias positivas en la inhibición de la formación de *biofilms* en *S. aureus* y *L. monocytogenes*, además de en las especies de *P. aeruginosa* y *C.*

parapsilosis cuando se utilizó en combinación con Ag. Ensayos recientes del uso de SiO₂ han presentado resultados prometedores frente a la formación de biofilms en *P. aeruginosa* (Nsayef Muslim et al., 2021). Así mismo, el uso combinado de SiO₂ con nanopartículas de Ag también ha mostrado resultados positivos frente a la formación de *biofilms* de *P. aeruginosa* (Korzekwa et al., 2021). Estudios recientes muestran la biocompatibilidad de recubrimientos de nanoesferas de SiO₂ para su uso en la superficie de catéteres, así como, resultados favorables en la inhibición del crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* (Zhang et al., 2022). Otros estudios relacionados con la administración de fármacos mediante nanopartículas muestran la versatilidad del uso de nanopartículas de sílice en aplicaciones biomédicas, en especial, como terapia antimicrobiana, demostrando, así mismo, una buena eficacia frente a la formación de *biofilms* (Selvarajan et al., 2020).

Los recubrimientos de ZnO no han presentado tendencias tan optimistas como los demás nanomateriales, aunque si destaca en algunas bacterias Gram-negativas, en concreto en *P. aeruginosa* y la cepa de *S. enterica* CECT554. La actividad *antibiofilm* de ZnO se ha estudiado en *E. coli* O157:H7 y en dos cepas de *S. aureus* en las cuales se ha visto tanto inhibición de la formación de *biofilm* como del crecimiento celular (Lee et al., 2014). De forma general se puede observar una tendencia a una mayor disminución del crecimiento en los recubrimientos combinados de ZnO + Ag en contraste con los de sólo ZnO. Estos resultados van en concordancia con los estudios de Thaya *et al.* donde demuestran que el efecto antimicrobiano del ZnO aumenta cuando se le agregan nanopartículas de Ag (Thaya et al., 2016). El grado de toxicidad del ZnO es selectivo, es decir, tiene un efecto mínimo en las células humanas, mientras que ante bacterias activa mecanismos de inducción de especies reactivas de oxígeno y daño en la membrana celular, interaccionando posteriormente con el contenido intracelular (Allaker, 2012).

Las principales debilidades de este trabajo son a nivel estadístico, debido a la limitación de replicados de cada pieza metálica utilizadas en el estudio, por lo que será necesario un estudio en profundidad con un mayor número de réplicas que permitan darle una mayor potencia estadística. Otra de las limitaciones es la generación de *biofilms* con una especie única que facilita su estudio, sin embargo, se aleja de las condiciones que existen en la industria alimentaria, ya que, aunque el *biofilm* puede estar formado por una especie

bacteriana concreta, generalmente tienen una estructura compleja constituida por varias especies que cooperan en su formación. Además, en este tipo de estudios en estático se deberían considerar determinados factores que afectan a su formación, como puede ser el flujo del líquido en el caso de conductos o tuberías o la capacidad de disgregación celular y posterior colonización de nuevas estructuras.

Una de las dificultades técnicas en la industria alimentaria es la gran diversidad de patógenos que se pueden encontrar en la cadena alimentaria, con grandes diferencias entre sectores de la propia industria, lo que dificulta enormemente encontrar un único tratamiento efectivo. En este trabajo se han utilizado prototipos de piezas de un tamaño reducido, por lo que harían falta estudios de fabricación a gran escala a un coste contenido para su posterior estudio e implementación en la industria. Por otro lado, el método de fabricación de las piezas produce una deposición aleatoria de las nanopartículas metálicas en la superficie, por lo que las proporciones de cada metal serán diferentes en cada pieza. Además, durante el lavado de las piezas, los diferentes tratamientos pueden desgastar su superficie y debido a que se han utilizado las mismas réplicas para cada uno de los microorganismos el proceso de desgaste es acumulativo. Por último, antes de su uso se necesitarían realizar estudios de degradación y descomposición de las estructuras metálicas nanoestructuradas y de la liberación de iones metálicos a lo largo del tiempo, así como estudios *in vitro* e *in vivo* de su potencial toxicidad.

A pesar de las limitaciones resultantes, mediante este estudio preliminar se ha podido comprobar que los recubrimientos de nanomateriales metálicos son una posibilidad relevante a tener en cuenta en la industria alimentaria frente a la formación de *biofilms*, en especial de bacterias patógenas, que generan grandes problemas y costes económicos en el sector agroalimentario.

5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se presentan las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado, de forma preliminar, que el empleo de piezas metálicas con recubrimientos nanoestructurados puede constituir una opción viable para la inhibición de la formación de *biofilms* en la industria alimentaria.
2. Se ha demostrado un efecto inhibitorio destacable en las piezas metálicas nanoestructuradas con SiO₂ y ZnO, especialmente cuando se combinan con plata, en las especies bacterianas *S. aureus*, *S. entérica* y *P. aeruginosa*. Por el contrario, en las especies *L. monocytogenes* y *C. parapsilosis* el efecto *antibiofilm* ha sido muy limitado.

BIBLIOGRAFÍA

- Aesan—Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2023). https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subseccion/otras_alertas_alimentarias.htm
- Ahmed, O. B. (2020). Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Classical Enterotoxin Genes Among Sudanese Food Handlers. *Cureus*, *12*(12). <https://doi.org/10.7759/cureus.12289>
- Allaker, R. P. (2012). The Use of Antimicrobial Nanoparticles to Control Oral Infections. En N. Cioffi & M. Rai (Eds.), *Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects* (pp. 395-425). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-24428-5_14
- Beveridge, T. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, *76*(3), 111-118. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- Beyth, N., Hourri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., & Hazan, R. (2015). Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, e246012. <https://doi.org/10.1155/2015/246012>
- Bright, K. R., Gerba, C. P., & Rusin, P. A. (2002). Rapid reduction of *Staphylococcus aureus* populations on stainless steel surfaces by zeolite ceramic coatings containing silver and zinc ions. *The Journal of Hospital Infection*, *52*(4), 307-309. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1317>
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Microbial Biofilms in the Food Industry-A Comprehensive Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(4), 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>
-

- Ceri, H., Olson, M., Stremick, C., Read, R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(6), 1771-1776. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.6.1771-1776.1999>
- Cowan, M. M., Abshire, K. Z., Houk, S. L., & Evans, S. M. (2003). Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *30*(2), 102-106. <https://doi.org/10.1007/s10295-002-0022-0>
- Ćwiek, K., Bugla-Płoskońska, G., & Wieliczko, A. (2019). *Salmonella* biofilm development: Structure and significance. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, *73*, 937-943. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.7866>
- de J. Treviño-Rangel, R., González-González, J. G., Garza-González, E., & González, G. M. (2012). *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria*, *14*(56), 157-165.
- de Melo Pereira, G. V., Maske, B. L., de Carvalho Neto, D. P., Karp, S. G., De Dea Lindner, J., Martin, J. G. P., de Oliveira Hosken, B., & Soccol, C. R. (2022). What Is *Candida* Doing in My Food? A Review and Safety Alert on Its Use as Starter Cultures in Fermented Foods. *Microorganisms*, *10*(9), 1855. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091855>
- Fernández-Gómez, P., Muro-Fraguas, I., Múgica-Vidal, R., Sainz-García, A., Sainz-García, E., González-Raurich, M., Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., López, M., López, M., Toledano, P., Sáenz, Y., González-Marcos, A., & Alba-Elías, F. (2022). Development and characterization of anti-biofilm coatings applied by Non-

- Equilibrium Atmospheric Plasma on stainless steel. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 152, 109891. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109891>
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretro, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kačániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., & Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6, 841. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
- Gómez-Molero, E., De-la-Pinta, I., Fernández-Pereira, J., Groß, U., Weig, M., Quindós, G., de Groot, P. W. J., & Bader, O. (2021). *Candida parapsilosis* Colony Morphotype Forecasts Biofilm Formation of Clinical Isolates. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 7(1), 33. <https://doi.org/10.3390/jof7010033>
- González, A. S., Riego, A., Vega, V., García, J., Galié, S., Gutiérrez del Río, I., Martínez de Yuso, M. del V., Villar, C. J., Lombó, F., & De la Prida, V. M. (2021). Functional Antimicrobial Surface Coatings Deposited onto Nanostructured 316L Food-Grade Stainless Steel. *Nanomaterials*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/nano11041055>
- Haney, E. F., Trimble, M. J., Cheng, J. T., Vallé, Q., & Hancock, R. E. W. (2018). Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides. *Biomolecules*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/biom8020029>

Haney, E. F., Trimble, M. J., & Hancock, R. E. W. (2021). Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. *Nature Protocols*, 16(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00515-3>

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 (AESAN-2010-002). (2010). AESAN. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/BIOFILMS.pdf

Junker, L. M., & Clardy, J. (2007). High-Throughput Screens for Small-Molecule Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3582-3590. <https://doi.org/10.1128/aac.00506-07>

Korzekwa, K., Kędziora, A., Stańczykiewicz, B., Bugła-Płoskońska, G., & Wojnicz, D. (2021). Benefits of Usage of Immobilized Silver Nanoparticles as *Pseudomonas aeruginosa* Antibiofilm Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 284. <https://doi.org/10.3390/ijms23010284>

Lee, J.-H., Kim, Y.-G., Cho, M. H., & Lee, J. (2014). ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiological Research*, 169(12), 888-896. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.005>

Lemon, K. P., Higgins, D. E., & Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4418-4424. <https://doi.org/10.1128/JB.01967-06>

- Li, X., Gu, N., Huang, T. Y., Zhong, F., & Peng, G. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1114199. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1114199>
- Listeria Outbreaks* | *Listeria* | CDC. (2023, junio 13). <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>
- Mahamuni-Badiger, P. P., Patil, P. M., Badiger, M. V., Patel, P. R., Thorat- Gadgil, B. S., Pandit, A., & Bohara, R. A. (2020). Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, *108*, 110319. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110319>
- Nsayef Muslim, S., Mohammed Ali, A. N., & Auda, I. G. (2021). Anti-biofilm and anti-virulence effects of silica oxide nanoparticle-conjugation of lectin purified from *Pseudomonas aeruginosa*. *IET Nanobiotechnology*, *15*(3), 318-328. <https://doi.org/10.1049/nbt2.12022>
- Qing, Y., Li, K., Li, D., & Qin, Y. (2020). Antibacterial effects of silver incorporated zeolite coatings on 3D printed porous stainless steels. *Materials Science and Engineering: C*, *108*, 110430. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110430>
- Quintieri, L., Zühlke, D., Fanelli, F., Caputo, L., Liuzzi, V. C., Logrieco, A. F., Hirschfeld, C., Becher, D., & Riedel, K. (2019). Proteomic analysis of the food spoiler *Pseudomonas fluorescens* ITEM 17298 reveals the antibiofilm activity of the pepsin-digested bovine lactoferrin. *Food Microbiology*, *82*, 177-193. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.003>

- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- Radovanovic, R. S., Savic, N. R., Ranin, L., Smitran, A., Opavski, N. V., Tepavcevic, A. M., Ranin, J., & Gajic, I. (2020). Biofilm Production and Antimicrobial Resistance of Clinical and Food Isolates of *Pseudomonas spp.* *Current Microbiology*, 77(12), 4045-4052. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02236-4>
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Rajkowska, K., & Kunicka-Styczyńska, A. (2018). Typing and virulence factors of food-borne *Candida spp.* Isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 279, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.002>
- Schelin, J., Susilo, Y. B., & Johler, S. (2017). Expression of Staphylococcal Enterotoxins under Stress Encountered during Food Production and Preservation. *Toxins*, 9(12), 401. <https://doi.org/10.3390/toxins9120401>
- Selvarajan, V., Obuobi, S., & Ee, P. L. R. (2020). Silica Nanoparticles—A Versatile Tool for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00602>
- Silva, S., Teixeira, P., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2008). Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1379-1385. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.7.1379>

- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
- Thaya, R., Malaikozhundan, B., Vijayakumar, S., Sivakamavalli, J., Jeyasekar, R., Shanthi, S., Vaseeharan, B., Ramasamy, P., & Sonawane, A. (2016). Chitosan coated Ag/ZnO nanocomposite and their antibiofilm, antifungal and cytotoxic effects on murine macrophages. *Microbial Pathogenesis*, 100, 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.09.010>
- Wang, H., Ding, S., Dong, Y., Ye, K., Xu, X., & Zhou, G. (2013). Biofilm formation of *Salmonella* serotypes in simulated meat processing environments and its relationship to cell characteristics. *Journal of Food Protection*, 76(10), 1784-1789. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-093>
- Yi, S.-Y., Lin, H.-Y., Yang, L.-C., Tseng, S.-C., Sun, A. Y., Chen, C., & Wan, D. (2022). Substrate-independent adsorption of nanoparticles as anti-biofilm coatings. *Biomaterials Science*, 10(2), 410-422. <https://doi.org/10.1039/d1bm01580j>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>
- Yuan, L., Hansen, M. F., Røder, H. L., Wang, N., Burmølle, M., & He, G. (2020). Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(13), 2277-2293. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1632790>
- Zhang, W., Du, J., Zhu, T., & Wang, R. (2022). SiO₂ nanosphere coated tough catheter with superhydrophobic surface for improving the antibacteria and

hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1067139.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1067139>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Valores brutos de la luminiscencia (RLU) y del porcentaje de crecimiento para *C. parapsilosis*.

<i>C. parapsilosis</i> SMI828						
	RLU			Porcentaje de crecimiento		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Ag	740054	609752	514850	85%	70%	59%
ZnO	677881	897844	793717	78%	104%	92%
SiO ₂	407621	870768	723583	47%	100%	83%
SiO ₂ + Ag	683423	685445	362343	79%	79%	42%
ZnO + Ag	164945	669885	991464	19%	77%	114%
Control +	861088	1036550	704512	99%	120%	81%
Control -	2336,26	2280,24	2338,26			

Tabla S2. Valores brutos de la luminiscencia (RLU) y del porcentaje de crecimiento para *L. monocytogenes*.

<i>L. monocytogenes</i> CECT911						
	RLU			Porcentaje de crecimiento		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Ag	121795	78371,6	217425	75%	48%	134%
ZnO	162187	82093,5	224081	100%	51%	139%
SiO ₂	100169	122985	191462	62%	76%	118%
SiO ₂ + Ag	245251	95204,1	269903	152%	59%	167%
ZnO + Ag	305976	274207	113242	189%	170%	70%
Control +	132615	204491	147869	82%	126%	91%
Control -	16	26				

Tabla S3. Valores brutos de la luminiscencia (RLU) y del porcentaje de crecimiento para *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853						
	RLU			Porcentaje de crecimiento		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Ag	174349	139152	303741	47%	38%	82%
ZnO	96245,4	180730	151741	26%	49%	41%
SiO ₂	314524	172707	229193	85%	47%	62%
SiO ₂ + Ag	140362	171113	77068,2	38%	46%	21%
ZnO + Ag	180553	506231	159637	49%	137%	43%
Control +	402314	483999	221465	109%	131%	60%
Control -	18	14				

Tabla S4. Valores brutos de la luminiscencia (RLU) y del porcentaje de crecimiento para *S. enterica* CECT443.

<i>S. enterica</i> CECT443						
	RLU			Porcentaje de crecimiento		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Ag	10823,5	14770,2	65161	18%	24%	106%
ZnO	46957,4	27052,4	81148,3	76%	44%	132%
SiO ₂	63975,8	100254	145894	104%	163%	237%
SiO ₂ + Ag	13412,4	15172,8	118219	22%	25%	192%
ZnO + Ag	11476,2	70802,8	5389,37	19%	115%	9%
Control +	22419,6	106502	55916,6	36%	173%	91%
Control -	30	16				

Tabla S5. Valores brutos de la luminiscencia (RLU) y del porcentaje de crecimiento para *S. enterica* CECT554.

<i>S. enterica</i> CECT554						
	RLU			Porcentaje de crecimiento		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Ag	17252	36185,4	24973,3	59%	124%	86%
ZnO	8501,4	9572,31	8897,72	29%	33%	31%
SiO ₂	11556,3	6369,91	20525,8	40%	22%	70%
SiO ₂ + Ag	16106,2	2974,42	4725,05	55%	10%	16%
ZnO + Ag	26404,7	9770,48	10601,3	91%	34%	36%
Control +	48851,9	25237,9	13384,4	168%	87%	46%
Control -	2388,27					

Tabla S6. Valores brutos de la luminiscencia (RLU) y del porcentaje de crecimiento para *S. enterica* CECT556.

<i>S. enterica</i> CECT556						
	RLU			Porcentaje de crecimiento		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Ag	9632,36	17987,2	53864	25%	46%	139%
ZnO	11566,3	24416	65380,3	30%	63%	169%
SiO ₂	63931,5	46850,9	120782	165%	121%	312%
SiO ₂ + Ag	58440,1	10397,1	30401,4	151%	27%	79%
ZnO + Ag	17049,7	15168,8	42382,3	44%	39%	110%
Control +	18572,2	23032,9	74483,8	48%	60%	192%
Control -	36	20				

Tabla S7. Valores brutos de la luminiscencia (RLU) y del porcentaje de crecimiento para *S. enterica* CECT698.

<i>S. enterica</i> CECT698						
	RLU			Porcentaje de crecimiento		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Ag	122495	150170	119975	68%	83%	66%
ZnO	344041	257636	61931,8	190%	142%	34%
SiO ₂	291237	61674,3	179642	161%	34%	99%
SiO ₂ + Ag	139407	60270,2	155346	77%	33%	86%
ZnO + Ag	121611	221719	112437	67%	123%	62%
Control +	118757	199169	224525	66%	110%	124%
Control -	40	38				

Tabla S8. Valores brutos de la luminiscencia (RLU) y del porcentaje de crecimiento para *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> CECT240						
	RLU			Porcentaje de crecimiento		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Ag	788284	390429	725680	95%	47%	87%
ZnO	366691	428706	661785	44%	52%	80%
SiO ₂	348459	397880	401158	42%	48%	48%
SiO ₂ + Ag	498831	413308	204566	60%	50%	25%
ZnO + Ag	693614	820777	756916	83%	99%	91%
Control +	781573	488086	1223040	94%	59%	147%
Control -	784,029					