



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Probióticos como estrategia de biocontrol frente a patógenos

Alumno/a: Sara Soto Aguilar



UNIVERSIDAD
DE JAÉN

Facultad de
Ciencias Experimentales 

Trabajo Fin de Grado

Probióticos como estrategia de biocontrol frente a patógenos



Alumna: Sara Soto Aguilar

Jaén, Junio 2023

Índice

Resumen.....	1
Abstract	1
1. Introducción	2
1.1. ¿Qué son los probióticos?	2
1.1.1. <i>Propiedades</i>	4
1.1.2. <i>Bacterias del ácido láctico (BAL)</i>	6
1.1.2.1. <i>Bacteriocinas</i>	6
1.1.2.1.1. <i>Mecanismos de acción y funciones</i>	8
1.1.3. <i>Otros probióticos: Saccharomyces boulardii</i>	9
1.2. Biofilm o biopelículas bacterianas	10
1.3. Estrategias de biocontrol en la industria alimentaria utilizando microorganismos vivos	13
1.3.1. <i>Bioconservación</i>	13
1.3.2. <i>Biofertilizantes y Biopesticidas</i>	14
1.3.3. <i>Biodesinfección</i>	15
2. Objetivos	16
3. Metodología	17
4. Resultados y discusión	18
5. Conclusión	39
6. Bibliografía	40
6.1. Referencias imágenes y tablas.....	47

Resumen

El uso de microorganismos probióticos como estrategia de biocontrol se está convirtiendo en un área de investigación en crecimiento que ofrece alternativas más seguras y sostenibles para el control de patógenos en la producción de alimentos.

En esta revisión bibliográfica, se destacan las estrategias innovadoras que utilizan probióticos como agentes de biocontrol para reducir el uso de productos químicos en distintas industrias destinadas al consumo humano.

Se analizarán y discutirán estudios *in vitro* e *in vivo* enfocados en demostrar la eficacia de biopelículas formadas por bacterias del ácido láctico con potencial probiótico contra patógenos comunes en la industria alimentaria, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli*.

Abstract

The use of probiotic microorganisms as a biocontrol strategy is becoming a growing area of research that offers safer and more sustainable alternatives for the control of pathogens in food production.

In this bibliographical review, innovative strategies that use probiotics as biocontrol agents to reduce the use of chemical products in different industries for human consumption are highlighted.

In vitro and *in vivo* studies focused on demonstrating the efficacy of biofilms formed by lactic acid bacteria with probiotic potential against common pathogens in the food industry, such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Escherichia coli*, will be analyzed and discussed.

Palabras clave: probióticos, bacterias del ácido láctico, bacteriocinas, biofilm, biocontrol, biodesinfección

Key words: probiotics, lactic acid bacteria, bacteriocins, biofilm, biocontrol, biodesinfection.

1. Introducción

1.1. ¿Qué son los probióticos?

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos son “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped” (FAO/OMS, 2002). De manera que, se puede decir que son un grupo de microorganismos vivos, en su mayoría bacterias, que gracias a sus propiedades presentan una serie de utilidades en distintos sectores destinados al consumo humano como pueden ser la industria alimentaria, ganadería, biotecnología o biomedicina entre otros.

La palabra “probiótico” tiene su origen del griego: “pro” y “bios” que, en conjunto, significan “a favor de la vida”. Por lo tanto, como su propio nombre indica, son microorganismos con propiedades favorables para la salud (Khaneghah et al., 2020). Para determinar si un microorganismo puede clasificarse como probiótico o no, en 2002 un grupo de investigación perteneciente a la FAO, en conjunto con la OMS, elaboró una lista de directrices usadas para la clasificación de un microorganismo como probiótico. Gracias a estas directrices, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha desarrollado una lista de microorganismos que son seguros y están autorizados por la Unión Europea (UE) para su uso como probióticos. Además, el uso de probióticos en la alimentación está regido por el Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 20 de noviembre de 2006 (E.C. 2007).

Posteriormente, en 2014 un panel de expertos de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) evaluó la definición de probiótico anteriormente definida por la FAO/OMS en 2002 teniendo en cuenta las directrices y los avances científicos, concluyendo que a día de hoy sigue siendo la definición más aceptada (Hill et al., 2014). Aun así, en 2018 los puntos y directrices para definir un microorganismo como probiótico fueron cuestionados de nuevo por ISSAP (Binda, S. et al., 2020).

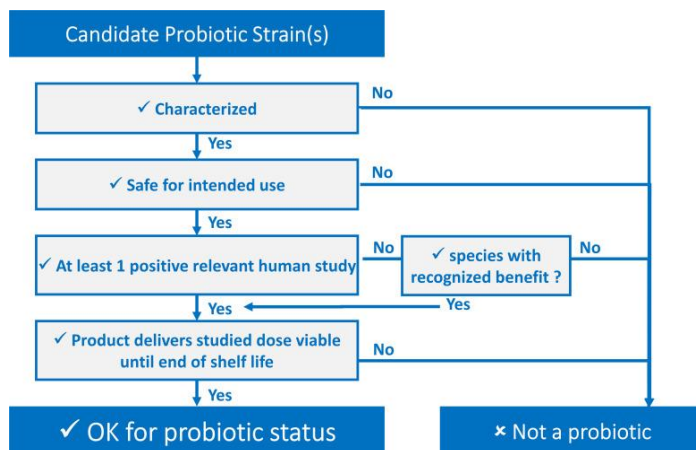


Figura 1.1. Árbol de decisión elaborado por ISSAP para determinar si un probiótico candidato cumple con los criterios de definición (adaptado de Binda, S. *et al.*, 2020).

En la figura 1.1., se indica en forma de árbol de decisiones los criterios establecidos por ISSAP en 2018 para determinar si un microorganismo puede definirse como probiótico o no. En primer lugar, una cepa o un microorganismo debe estar caracterizado, es decir, estar bien identificado y tener asignado un nombre adecuado que siga la nomenclatura bacteriana válida de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura (Parker et al., 2019). El nombre adecuado debe incluir el género, la especie, subespecie (si la hubiese) y el número de catálogo de una colección de cultivo reconocida o comercial. Para que una cepa esté caracterizada, debe de conocerse la secuencia completa de su genoma (WGS). En segundo lugar, deben de haberse realizado pruebas in vitro para detectar las características propias generales de un microorganismo probiótico teniendo en cuenta que una característica propia de un probiótico es específica de cada cepa. En tercer lugar, la cepa debe de ser segura para su uso, es decir, debe de cumplir los requisitos de seguridad estipulados por el regulador nacional y/o regional y estar incluida en la lista de especies que son seguras elaborada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Finalmente, para considerar un microorganismo como probiótico es necesario que esté respaldado, al menos, por un ensayo clínico en humanos que pruebe que realmente aporta beneficios para la salud. (Vandenplas et al; 2015; Binda, S. et al., 2020).

Los probióticos tienen multitud de aplicaciones como agentes de control biológico y bioterapéutico. Entre ellas podemos destacar su aplicación en terapias contra el cáncer, modulación de la microbiota intestinal así como su uso en la mejora de la calidad y seguridad alimentaria. La utilidad más estudiada es el uso de probióticos como complemento alimenticio comercializado. Numerosos estudios avalan el uso de probióticos como suplemento alimenticio y/o complemento tras el tratamiento de patologías con antibióticos (Sadeghi et al., 2022). Estos microorganismos deben ser seguros para el huésped y pueden proporcionar efectos preventivos o curativos. (Vandenplas, Y. et al; 2015).

Los géneros más estudiados y clasificados como probióticos son los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*. Estos géneros entran a formar parte del grupo de las bacterias productoras de ácido láctico (LAB). Además, algunas cepas del género *Bacillus* y cepas no patógenas de *Escherichia coli* son consideradas como probióticos. Dentro del grupo de las levaduras, sólo hay un género de levadura considerada como probiótico: *Saccharomyces boulardii* (Castañeda, 2018).

1.1.1. Propiedades

Para que un microorganismo sea identificado como probiótico debe de presentar unas propiedades específicas que lo caractericen como tal. Estas son las siguientes:

a. Resistencia a: pH ácido y sales biliares

Los microorganismos probióticos son capaces de adaptarse a situaciones de estrés como condiciones de pH bajo o altas concentraciones de sales biliares; es por ello que la mayoría se encuentran formando parte de la microbiota intestinal siendo resistentes a enzimas gastrointestinales como la lisozima o la pepsina. Los mecanismos que les permiten soportar estas situaciones están ligados a modificaciones de la pared celular formando polímeros de carbohidratos, hidrolasas y osmolitos, entre otros, que ajustan

la composición lipídica de la membrana como respuesta al estrés (Sadeghi et al., 2022).

b. Adhesión

Otra propiedad importante de los microorganismos probióticos es su capacidad de adhesión a las superficies tanto bióticas como abióticas. Como consecuencia, los probióticos pueden competir con otros microorganismos patógenos por los nutrientes presentes en las zonas de adhesión. Este mecanismo recibe el nombre de competencia por exclusión o exclusión competitiva (Khaneghah et al., 2020). Los microorganismos probióticos son capaces de competir por los nutrientes presentes en las zonas de adhesión gracias a la producción de ácidos grasos de cadena corta y otros ácidos que reducen el pH del sitio de unión impidiendo la adhesión de microorganismos patógenos y aumentando así el efecto bactericida.

c. Actividad antimicrobiana

Los probióticos segregan sustancias bactericidas como son las bacteriocinas, ácidos orgánicos y especies oxígeno reactivas, como el peróxido de hidrógeno que aumentan el estrés oxidativo de los microorganismos patógenos inhibiendo así su acción (Vandenplas, Y. et al; 2015).

Tabla 1.1. Resumen de las propiedades de los microorganismos probióticos. Fuente: elaboración propia.

PROPIEDADES	
Resistencia a pH ácido y sales biliares	<ul style="list-style-type: none">- Condiciones de pH ácido- Alta concentración de sales biliares
Adhesión	<ul style="list-style-type: none">- Competencia por exclusión o exclusión competitiva por nutrientes
Actividad antimicrobiana	Secreción de: <ul style="list-style-type: none">- Bacteriocinas- Ácidos orgánicos- Especies oxígeno reactivas (ROS)

1.1.2. Bacterias del ácido láctico (BAL)

Las bacterias del ácido láctico o BAL, son un grupo importante de probióticos “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) (Mafu et al., 1990) que se encuentran situados en ambientes muy diversos como productos lácteos, frutas y verduras frescas o cereales fermentados (Grosu-Tudor et al., 2014). Las bacterias del ácido láctico, son bacterias Gram positivas, catalasas negativas, no formadoras de esporas y microaerófilas. Entre sus géneros, los más importantes son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus* (Speranza et al., 2020).

Una característica a destacar en las bacterias del ácido láctico, es su capacidad para producir péptidos antimicrobianos (AMP) que reciben el nombre de bacteriocinas. Estos péptidos antimicrobianos o bacteriocinas son secretados por las bacterias del ácido láctico junto con otros compuestos (ácido láctico, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno) que, en conjunto, se encargan de disminuir el pH de los sitios de unión para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y, así, ejercer su función (Gálvez et al., 2010; Kleerebezem M., 2004).

1.1.2.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y arqueas, que impiden la proliferación de cepas bacterianas patógenas. Actúan atacando la membrana plasmática de los microorganismos patógenos formando poros en la bicapa lipídica que afectan a la fuerza protón-motriz (Ruiz et al., 2017) y se sintetizan como péptidos precursores inactivos en los ribosomas. Tienen una longitud de 20 a 60 aminoácidos y suelen ser cargados positivamente a pH neutro o ligeramente ácido, con secuencias hidrofóbicas o anfifílicas (revisado por Eijsink et al., 2002; Ennahar et al., 2000).

La producción de bacteriocinas está regulada por la densidad celular y comienza con la acumulación de feromonas en el medio de crecimiento. Estas feromonas desencadenan la producción de bacteriocinas cuando alcanzan una concentración

máxima. Este proceso se basa en el mecanismo de detección de quorum, donde las bacterias transmiten información entre sí a través de señales químicas en respuesta a cambios en la densidad celular de la comunidad bacteriana (Kleerebezem M., 2004; Zhao et al., 2017).

En las revisiones de Eijsink et al. (2002) y Moll et al. (1999), se exponen por un lado, las características propias a nivel estructural y funcional de las bacteriocinas secretadas por las bacterias del ácido láctico; y por otro lado su clasificación más aceptada que es la siguiente (tabla 1.2).

Tabla 1.2. Clasificación de bacteriocinas (clase I, II y III). Fuente: elaboración propia.

Tipos de bacteriocinas	
Clase I termoestables con lantionina (lantibióticos)	Tipo A: alargada
	Tipo B: globular
Clase II estables al calor sin lantionina (no lantibióticos)	Subclase IIa: inhiben a <i>Listeria monocytogenes</i>
	Subclase IIb: dos péptidos
	Subclase IIc: otras bacteriocinas
Clase III (no lantibióticos)	Antimicrobianas protéicas

Más adelante, estudios como el de Grosu-Tudor et al., 2014 han clasificado y caracterizado bacteriocinas producidas por nuevas cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados.

Se puede decir que la secreción de bacteriocinas representa una estrategia natural de defensa utilizada por las bacterias del ácido láctico para competir y sobrevivir en su entorno.

1.1.2.1.1. Mecanismos de acción y funciones

Una vez que las bacteriocinas son segregadas por las bacterias del ácido láctico, estas pueden ejercer distintas funciones:

- Péptidos colonizadores: facilitan la adhesión y la competencia de un probiótico contra un patógeno.
- Péptidos letales o inhibidores: eliminan directamente los patógenos adheridos a la zona de adhesión.
- Péptidos de señalización: permiten la sincronización bacteriana e intervienen como péptido señal en la detección de quórum (figura 1.2).

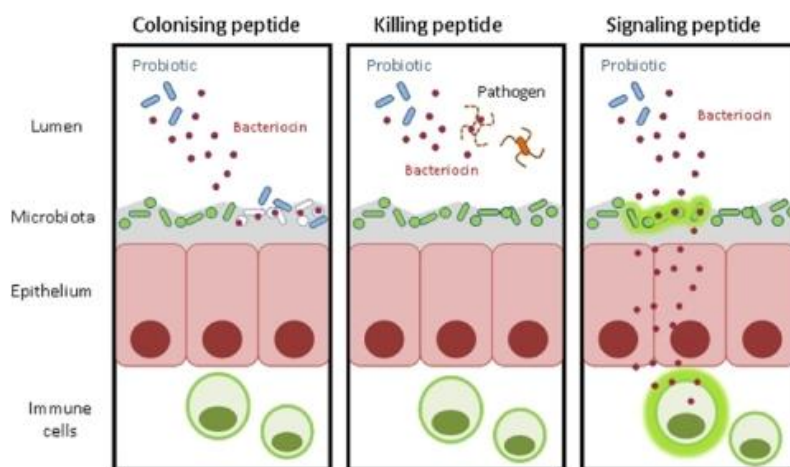


Figura 1.2. Mecanismos de acción de bacteriocinas como péptido colonizador, letal o de señalización (adaptado de Dobson, A. *et al.*, 2012)

Para poder ejercer dichas funciones, las bacteriocinas forman poros en la membrana de las células diana o patógenos. Con la formación de poros causan efectos como agotamiento de ATP intracelular, disipación de la fuerza protón motriz de la membrana; lo que implica a su vez fuga de pirofosfato inorgánico (Pi) y de nutrientes (Eijsink *et al.*, 2002). Además, tiene lugar la disminución del pH de la membrana lo que mejora la capacidad de unión de la bacteriocina (Ennahar *et al.*, 2000). Son capaces de formar poros en las membranas plasmáticas gracias a la interacción entre la propia bacteriocina, que está cargada positivamente, con los lípidos aniónicos de la

membrana. De manera que, las bacteriocinas forman poros en la membrana gracias a la interacción electrostática que se forma (Eijsink et al., 2002).

1.1.3. Otros probióticos: *Saccharomyces boulardii*

A pesar de que la gran mayoría de microorganismos que tienen características probióticas son organismos procariotas, también existen otros microorganismos con estas características. Estos, pertenecen al reino Fungi y son las levaduras; en concreto la especie *Saccharomyces boulardii* (Czerucka et al., 2007).

Se ha demostrado que *S. boulardii* es eficaz en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, como aquellas causadas por *Clostridium difficile*. Esta levadura puede sobrevivir en el tracto gastrointestinal y tiene la capacidad de modular la respuesta inmunológica del huésped (Czerucka et al., 2007).

El modo de acción de *S. boulardii* contra los patógenos se basa en la segregación de proteínas que neutralizan las toxinas y en la modulación de la vía de señalización de las células huésped (Czerucka et al., 2007). También puede segregar aminoácidos que promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas del ácido láctico (revisado por Staniszewski et al., 2021).

Una ventaja de usar *S. boulardii* como probiótico en lugar de bacterias es que la levadura no transmite genes de resistencia a los patógenos (Czerucka et al., 2007). Sin embargo, hasta ahora, su uso se ha limitado a fines terapéuticos y no se ha empleado en el procesamiento de alimentos. Se están investigando otras levaduras, como *Hanseniaspora*, *Toluraspora* o *Pichia*, que podrían tener características probióticas y ser utilizadas en el futuro (Lazo-Vélez et al., 2018; Staniszewski et al., 2021).

1.2. Biofilm o biopelículas bacterianas

Un biofilm o biopelícula se define como una comunidad de microorganismos que crecen en el interior de una matriz extracelular producida por ellos mismos que les permite adherirse a una superficie inerte o un tejido vivo (Lasa et al., 2005; Rather et al., 2021).

El proceso de formación de un biofilm o biopelícula consiste, en primer lugar, en la adhesión del microorganismo a una superficie. La adhesión tiene lugar gracias a la motilidad en bacterias Gram negativas o bien gracias a proteínas de superficie de membrana de las bacterias Gram positivas. Algunas bacterias se adhieren a superficies gracias a la unión de las proteínas de membrana con nutrientes presentes en la zona y otras se extienden produciendo un césped uniforme de bacterias adheridas (Costerton, 1995). Se ha visto que hay una molécula de señalización muy importante en la etapa temprana de la formación de un biofilm: se trata de bis (3'-5')-guanosina monofosfato dimérico cíclico (c-di- GMP). Esta molécula, se encarga de restringir la motilidad plantónica y de estimular la formación de la matriz extracelular (Rather et al., 2021). Además, la unión de los microorganismos a una superficie se ve influenciada en las propiedades de la superficie, es decir, en la rugosidad, carga, hidrofobicidad, etc. Por ejemplo, la adhesión es mucho más fácil en superficies húmedas debido a las interacciones hidrofóbicas que se forman (Zhao et al., 2017).

Cuando los microorganismos consiguen adherirse a la superficie, comienza la división celular y la formación de microcolonias. Las microcolonias son unidades organizativas básicas de las biopelículas, que, una vez formadas, secretan exopolisacáridos que conforman la matriz de la biopelícula. En esta etapa, la concentración de c-di-GMP es muy alta ya que estimula la formación de la matriz (Rather et al., 2021). La matriz se caracteriza por presentar canales de agua en su interior que permiten el paso de nutrientes, agua y oxígeno a través de la misma para garantizar la supervivencia y crecimiento de los microorganismos que forman la biopelícula (Lasa et al., 2005). La formación de la matriz extracelular provoca la conformación de distintos hábitats

localizados dentro de la biopelícula, es decir, se crea un gradiente estable de nutrición, pH, productos de desecho y oxígeno. Dentro de este hábitat, se forman conexiones como competencia o cooperación entre las células bacterianas en el interior de la biopelícula que influyen en la estabilidad y maduración de la misma (Barzegari et al., 2020). El papel de la matriz extracelular en una biopelícula es muy importante puesto que interfiere en la unión de los microorganismos a la superficie y estabiliza la estructura tridimensional de la biopelícula durante su formación agrupando y protegiendo a las células.

La estructura, forma y disposición de la matriz influye bastante en la resistencia a antibióticos y en la actividad de las bacterias que conforman la biopelícula. Además, es específica de cada cepa (Rather et al., 2021).

Una biopelícula madura o un biofilm maduro se caracteriza por tener una forma de hongo o torre donde los microorganismos se organizan en función de su metabolismo. Se diferencian tres capas o superficies: capa reguladora interna, capa basal microbiana media y capa externa. La capa reguladora interna consiste en una película reguladora con estructura de red que cubre la superficie adherente; la capa basal microbiana media está compuesta por una membrana basal compacta y en la capa externa, se sitúan bacterias en su forma planctónica dispuestas a salir de la biopelícula para colonizar otras superficies y formar nuevas biopelículas (Zhao et al., 2017, Rather et al., 2021).

Este proceso que tiene lugar en la capa externa del biofilm maduro, recibe el nombre de dispersión y está condicionado por factores como una población microbiana alta dentro del propio biofilm, competencia por nutrientes, acción enzimática, condiciones ambientales como temperatura, deficiencia de oxígeno, acumulación de metabolitos, degradación de la matriz, etc. (Rather et al., 2021).

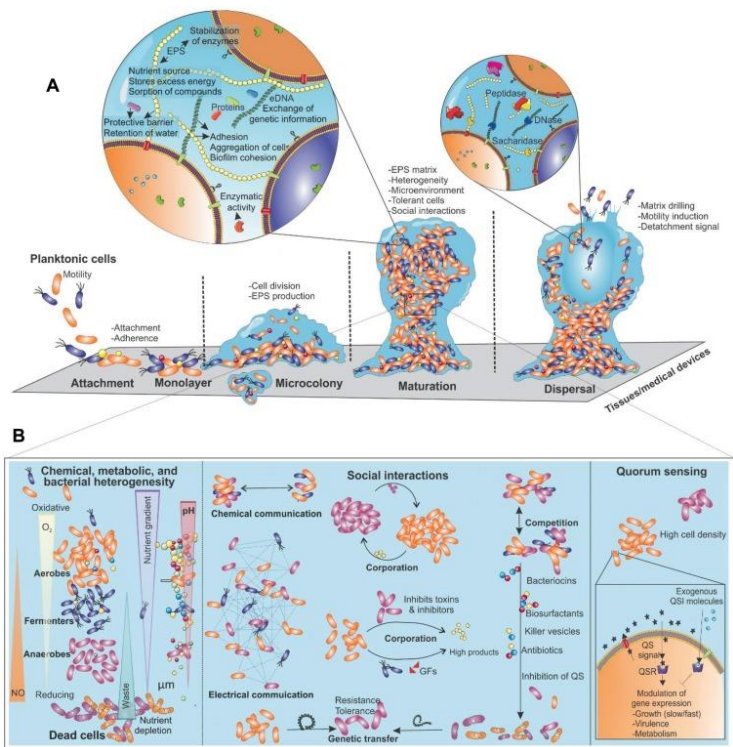


Figura 1.3. Etapas de formación de biopelículas en superficies abióticas o bióticas y estructura (a) Formación de la matriz extracelular e interacciones que tienen lugar en el interior de la biopelícula durante su formación y desarrollo (adaptado de Barzegari et al., 2020).

La composición de una biopelícula es bastante heterogénea y variable: entre un 10-25% se compone de células microbianas y entre el 75-90% de su composición le corresponde a la matriz extracelular. Entre medias, también existen huecos intersticiales o canales de agua que separan las colonias y permiten el flujo de nutrientes en la matriz.

Para la formación de una biopelícula así como para su supervivencia en una superficie determinada influyen los siguientes factores: factores ambientales (temperatura, pH), comunicación entre células, segundos mensajeros, condiciones hidrodinámicas, motilidad bacteriana, disponibilidad de proteínas y de nutrientes (Rather et al., 2021).

1.3. Estrategias de biocontrol en la industria alimentaria utilizando microorganismos vivos

Debido a la gran demanda de productos más sostenibles que está surgiendo en los últimos años, han aparecido nuevas estrategias o medidas de control biológico o biocontrol como alternativas sostenibles al uso de productos químicos en la agricultura y en la conservación de alimentos. El control biológico o biocontrol se define como un conjunto de estrategias sostenibles que emplean microorganismos para prevenir la proliferación de otros microorganismos patógenos (Sanjuán et al., 2023). Entre estas estrategias encontramos: la bioconservación, el uso de biofertilizantes y biopesticidas en la agricultura o la biodesinfección.

1.3.1. Bioconservación

La bioconservación implica el uso de probióticos para mejorar la calidad de los alimentos y prevenir el crecimiento de organismos patógenos. Estas prácticas se están investigando y aplicando en la industria alimentaria como alternativas a los conservantes químicos (Khaneghah et al., 2020; Zhao, 2004; Speranza et al., 2020).

Actualmente, entidades como EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) están desarrollando proyectos que aplican estrategias de bioconservación como alternativa a la propagación de enfermedades transmitidas por los alimentos. Además, el proyecto europeo: BIOCAMES está evaluando las principales mejoras con respecto a la aplicación de nuevas técnicas de bioconservación y biocontrol en industrias alimentarias (Calvo Crespo, 2020).

Un ejemplo a destacar dentro de este ámbito es el trabajo realizado por Ortu et al., (2005) que demostró la eficacia de que *Saccharomyces cerevisiae* para colonizar la superficie de heridas en manzana causadas por el moho azul de *Penicillium expansum* y así controlar la expansión del patógeno que causa la podredumbre de la manzana.

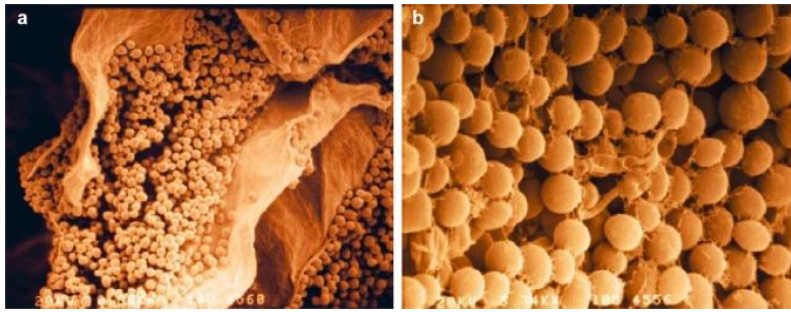


Figura 1.4. Colonización de *Saccharomyces cerevisiae* en la superficie interna de una manzana (a). Inhibición de la invasión de *Penicillium expansum* sobre la superficie de la manzana (b) (adaptado de Freimoser et al., 2019).

1.3.2. Biofertilizantes y Biopesticidas

Los microorganismos probióticos tienen propiedades antifúngicas y antibacterianas, lo que los hace útiles como biofertilizantes y biopesticidas. Los biofertilizantes son preparados de microorganismos vivos que aportan nutrientes a las plantas y mejoran la fertilidad del suelo. Los biopesticidas, por otro lado, son también preparados de microorganismos probióticos que inhiben la proliferación de patógenos. Estas alternativas son más ecológicas que los fertilizantes químicos y pueden aumentar el rendimiento de los cultivos.

Los biofertilizantes actúan a través de mecanismos como la fijación de Nitrógeno, la solubilización de fosfatos o la producción de fitohormonas (Sanjuán et al., 2023; Mahanty et al., 2017); mientras que los biopesticidas actúan a través de mecanismos como la competencia por nutrientes, la formación de biofilm protectores, la resistencia sistémica inducida y la secreción de enzimas o compuestos que degradan la membrana de los patógenos (Alori y Babalola, 2018).

Además, se ha visto que la aplicación de biofertilizantes es beneficiosa porque evita la acumulación de productos químicos en las aguas subterráneas y mejora la retención de agua en el suelo (Mahanty et al., 2017).

En definitiva, el uso de probióticos como biofertilizantes y biopesticidas es una alternativa sostenible para la agricultura, ya que brinda protección contra patógenos y

aporta nutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas, al tiempo que reduce la contaminación y el uso de productos químicos (Alori y Babalola, 2018).

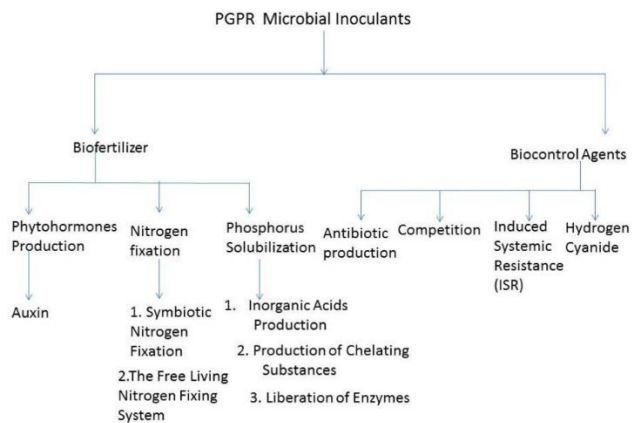


Figura 1.5. Representación esquemática de los mecanismos mediante los cuales los biofertilizantes son útiles como promotores del crecimiento vegetal y los biopesticidas como agentes de control biológico (adaptado de Alori y Babalola, 2018).

1.3.3. Biodesinfección

Según el Instituto Nacional de Salud (NIH), la mayoría de enfermedades bacterianas (65-80%) son causadas por biopelículas formadas por patógenos (Barzegari et al., 2020). Este es uno de los principales factores por lo que cada vez está aumentando más el interés en el uso de probióticos y sus derivados de interés en la aplicación para la lucha contra biofilms patógenos.

Se ha visto que las biopelículas compuestas por microorganismos beneficiosos o probióticos compiten por los nutrientes y colonizan la superficie donde están adheridos los microorganismos patógenos mediante el principio de exclusión competitiva o competencia por exclusión. Es decir, la competencia por exclusión consiste en la lucha por los sitios de adhesión, nutrientes y energía bloqueando así el crecimiento y la proliferación de microorganismos patógenos (Speranza et al., 2020). Los biofilm formados por bacterias del ácido láctico bloquean la formación temprana de la biopelícula de microorganismos patógenos centrándose en la etapa inicial de división celular y formación de la matriz extracelular.

La formación de biopelículas por parte de microorganismos probióticos supone una estrategia bastante novedosa y beneficiosa para luchar contra biopelículas patógenas ya que compiten por nutrientes y sitios de adhesión. Además, se ha visto que la producción de la matriz extracelular durante la formación de biofilm en probióticos es capaz de inhibir la formación de biopelículas patógenas. Esta estrategia supone un medio prometedor, ya que reduce y controla el crecimiento de patógenos sin suponer un riesgo para la salud de los consumidores (Barzegari et al., 2020).

En el apartado de “Resultados y discusión” de esta revisión, se van a exponer varios estudios que prueban el uso de biopelículas formadas por bacterias del ácido láctico contra biopelículas compuestas por microorganismos patógenos que tienden a acumularse en superficies inertes de plantas procesadoras de alimentos y, como consecuencia, generan enfermedades transmitidas por los alimentos.

2. Objetivos

La presente revisión bibliográfica tiene como objetivo principal analizar los distintos métodos de biocontrol de microorganismos patógenos en la industria alimentaria mediante el uso de biopelículas protectoras con probióticos. Para conseguir este objetivo principal se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

- Considerar y comparar los métodos de desinfección con probióticos frente a patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* o *Salmonella*.
- Evaluar la efectividad que tiene el uso de probióticos en la desinfección de instalaciones de la industria alimentaria como alternativa novedosa.
- Establecer las cepas más estudiadas y beneficiosas para garantizar la seguridad y la calidad alimentaria.

3. Metodología

Para la realización de este trabajo, se ha elaborado una revisión bibliográfica de documentos y artículos publicados en revistas y sociedades científicas sobre el uso de probióticos en la industria alimentaria; así como la capacidad de los probióticos para formar biopelículas protectoras y aplicarlas como método de biocontrol para garantizar la seguridad y calidad alimentaria.

Todos los artículos y documentos empleados han sido buscados en bases de datos como PubMed (NCBI), Science Direct (Elsevier), Google Scholar, Scielo y Scopus entre otras. Los términos empleados para la búsqueda o palabras clave han sido las siguientes: “probióticos”, “bioconservación”, “biofilm”, “bacteriocinas”, “bacterias del ácido láctico”, “uso de probióticos en alimentos”.

Para poder hacer una selección de todas las fuentes y artículos hallados, estos debían de tener una serie de condiciones o requisitos. En primer lugar, debían hacer referencia al uso de probióticos en la industria alimentaria y a la formación de biopelículas protectoras de las bacterias del ácido láctico; en definitiva, estar relacionados con los criterios de búsqueda.

En segundo lugar, solo se han podido considerar las investigaciones realizadas in vitro o in vivo en superficies abióticas ya que su acción en el interior de un huésped no es relevante para el desarrollo del trabajo. En total, se han considerado 9 estudios para el desarrollo de los resultados. En tercer lugar, todos los artículos tenían que tener un acceso libre completo sin ningún tipo de restricción.

No se ha considerado motivo de exclusión la fecha de publicación del artículo si su contenido es relevante para la realización de este trabajo. De manera que, hay fechas de publicación bastante variadas. Por último, se ha tenido en cuenta el idioma del artículo excluyéndose aquellos artículos cuyo idioma fuese distinto al inglés o español.

Tabla 3.1. Resumen de los criterios de inclusión de artículos utilizados para la realización de este trabajo. Fuente: elaboración propia

Criterios de inclusión para selección de artículos
Tratar sobre el uso de probióticos en industria alimentaria
Tratar sobre la formación de biofilm o biopelículas
Investigaciones realizadas in vitro o in vivo en superficies abióticas presentes en la industria
Acceso gratuito y texto completo
Fecha de publicación no relevante
Idioma: español o inglés

4. Resultados y discusión

- **Resultados**

A continuación, se exponen estudios realizados in vitro e in vivo que prueban la capacidad antibacteriana de los probióticos en forma de biofilm frente a los microorganismos patógenos más comunes en la industria alimentaria como son *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Salmonella sp.*, entre otros.

- **Estudios realizados in vitro**

- **Desarrollo de biopelículas probióticas tolerantes a la desecación que inhiben el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos en superficies de acero inoxidable (realizado por Kim et al., 2022)**

En este estudio, se desarrolla una biopelícula in vitro tolerante a la desecación y capaz de adherirse a superficies como acero inoxidable, cerámica o vidrio; superficies de gran interés debido a que este tipo de superficies son las que se encuentran habitualmente en las plantas procesadoras de alimentos. Para ello, se añadieron virutas o chips de acero inoxidable, polietileno y cerámica a las placas de Petri donde iban a cultivarse los patógenos y, posteriormente, los probióticos. Además, se determinó la resistencia a la desecación de la cepa probiótica utilizada porque es uno de los métodos de desinfección utilizados en industria y que, junto a la biopelícula en cuestión, podrían ser bastantes efectivos contra patógenos.

Se aislaron cepas probióticas de varios alimentos coreanos fermentados; de las cuales solo dos cepas mostraron capacidad de adhesión a las superficies anteriormente mencionadas, tolerancia a la desecación y actividad antimicrobiana contra los patógenos *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Salmonella entérica*. Las dos cepas aisladas y utilizadas para la formación de la biopelícula inhibidora fueron *Lactobacillus sakei* M129-1 y *Pediococcus pentosaceus* M132-2.

En la figura 4.1., se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana de ambas cepas y la reducción de la población de los patógenos sin biopelícula como control del estudio. Se puede observar que, en todas las gráficas, la línea que corresponde al control sin biopelícula disminuye entre 1,2 y 3,1 log CFU/cm² en 48 horas. Sin embargo, en las placas con biopelículas probióticas se observa cómo disminuye significativamente la población de todos los patógenos a partir de las 6 horas de incubación y con rangos de hasta 7 log CFU/cm² a las 48 horas del tratamiento.

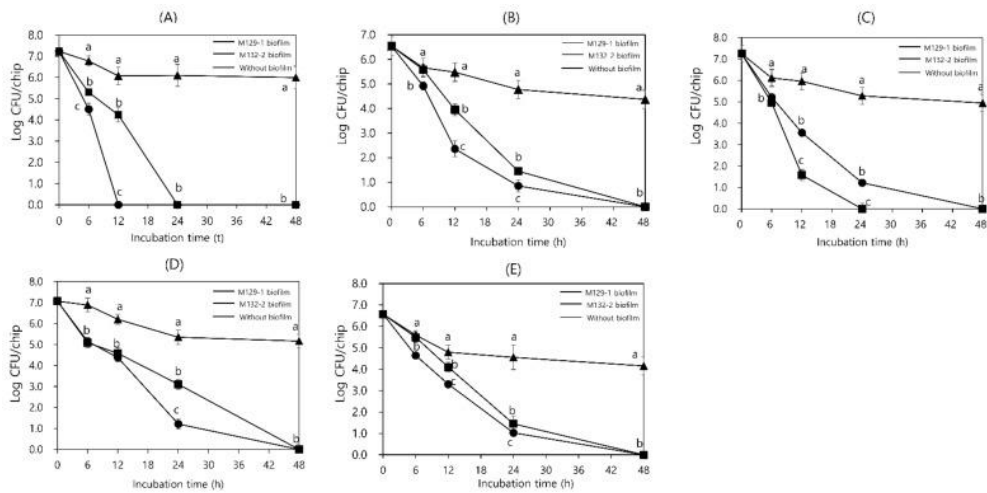


Figura 4.1. Cambios en las poblaciones de cinco patógenos, (A) *Escherichia coli* O157:H7, (B) *Staphylococcus aureus* , (C) *Listeria monocytogenes* , (D) *Bacillus cereus* , (E) *Salmonella enterica* , con o sin biopelículas de *Lactobacillus sakei* M129-1 o *Pediococcus pentosaceus* M132-2 (adaptado de Kim et al., 2022).

Estos resultados indican la efectividad antimicrobiana de las cepas *Lactobacillus sakei* M129-1 y *Pediococcus pentosaceus* M132-2 formadoras de biofilm y su posible aplicación futura a entornos de producción y procesado de alimentos.

- **Uso de biopelículas de bacterias del ácido láctico (LAB) potencialmente probióticas para el control de la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7 (realizado por Caballero Gómez et al., 2016)**

En este estudio, se realiza una evaluación de la aplicación de biopelículas formadas por cepas de bacterias del ácido láctico aisladas de alimentos brasileños productoras de bacteriocinas y no productoras de bacteriocinas contra la formación de biofilm de los siguientes patógenos: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7. Así como la evaluación de su potencial probiótico.

Las cepas aisladas productoras de bacteriocinas empleadas en este estudio fueron: *Lactococcus lactis* VB69, *L. lactis* VB94, *Lactobacillus sakei* MBSa1 y *Lactobacillus curvatus* MBSa3 así como cepas no productoras de bacteriocinas: *L.*

lactis 368, *Lactobacillus helveticus* 354, *Lactobacillus casei* 40 y *Weissella viridescens* 113.

En primer lugar, se realizó un análisis de las propiedades probióticas de estas cepas como son la resistencia a ácidos y sales biliares, capacidad de autoagregación y coagregación, resistencia a antibióticos y genes de virulencia.

En segundo lugar, se realizaron ensayos de biopelículas de estas cepas probióticas sobre biopelículas de los patógenos (anteriormente mencionados) ya formadas.

Los resultados fueron bastante favorables; cabe destacar que la cepa *Lactobacillus curvatus* MBSa3 fue la que mayor capacidad de coagregación mostró con *Listeria monocytogenes* (69 %) y *Escherichia coli* O157:H7 (74,6 %). La capacidad de coagregación es un rasgo importante puesto que permite ver como la cepa probiótica en forma de biofilm puede inhibir la formación de biofilm de patógenos.

Por otro lado, en los ensayos de biopelícula realizados se pudo observar como todas las biopelículas formadas por cepas probióticas fueron capaces de reducir la población de los microorganismos patógenos entre 5 y 3 log CFU/cm² para *Escherichia coli* O157:H7; hasta 4 log CFU/cm² para *Salmonella Typhimurium* y hasta 7 log CFU/cm² para *Listeria monocytogenes* a las 24, 48 y 72 horas de exposición (figura 4.2). Hay que tener en cuenta que la inhibición varía en función de la cepa probiótica, el tiempo, y el patógeno diana. Solamente tres cepas que no aparecen en la figura 4.2 mostraron capacidad de inhibición total a los tres patógenos. Estas cepas fueron: *L. lactis* 368 (no bacteriocígena), *Lactobacillus curvatus* MBSa3 (bacteriocígena) y *Lactobacillus sakei* MBSa1 (bacteriocígena).

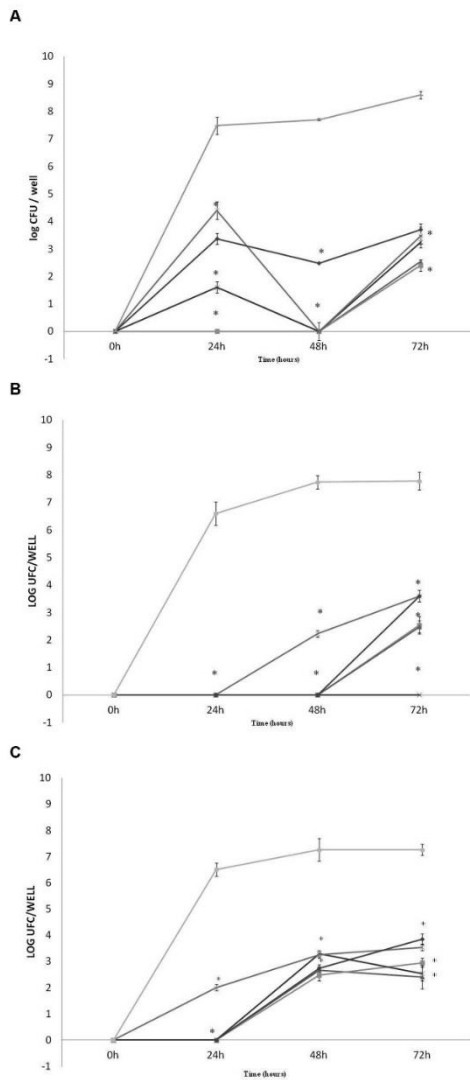


Figura 4.2. Cuantificación de biopelículas de patógenos en placas de microtitulación en caldo MRS (A, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, B, *S. Typhimurium* ATCC 14028, C, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150) en presencia de bacterias *W. viridescens* 113. (◆); *L. lactis* 69 bac+ (■); *L. lactis* 94 bac+ (▲); *Lactobacillus casei* 40 bac- (●) y *Lactobacillus helveticus* 352 bac- (⊠), biopelículas después de 24, 48 y 72 h a 30 °C. *Listeria monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7 Control positivo (◆) (adaptado de Caballero Gómez et al., 2016).

En la figura 4.2. (A), se puede ver que no hay presencia de *L. monocytogenes* en las biopelículas formadas por *L. lactis* 69 y 94. Sin embargo, en el resto de biopelículas si se observó presencia del patógeno pero hubo una reducción de su población de 7 log CFU/cm² en *L. casei* 40, de 4 log CFU/cm² en *L. helveticus* 352 y de 5 log CFU/cm²

en *W. viridescens* 113. Aun así, la presencia de *Listeria monocytogenes* aumentó un poco a las 72 horas de exposición.

En la figura 4.2. (B), no se aprecia actividad frente a *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en ninguna de las cepas ensayadas salvo en *Lactobacillus helveticus* 352. Después de 48 y 72 horas de exposición, no se mostró actividad ninguna solo por parte de *Lactobacillus casei* 40.

En la figura 4.2. (C), se detectaron solo 3 log CFU/cm² de *E. coli* O157:H7 en presencia de todas las cepas probióticas ensayadas.

Estos resultados indican que todas las cepas ensayadas independientemente de que segreguen o no bacteriocinas, son aptas para utilizarse como estrategia de control de patógenos en las plantas procesadoras de alimentos de la industria alimentaria; ya que muestran una reducción en la presencia de patógenos en comparación con las muestras control.

- **Evaluación del Potencial de formación de Biopelículas de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* y *Lactobacillus reuteri* como agentes competitivos de biocontrol frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos (realizado por Speranza et al., 2020)**

El objetivo principal de este estudio es probar la eficacia antibiofilm de dos cepas probióticas: *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* y *Lactobacillus reuteri* obtenidas de la colección de microorganismos del Leibniz-Institut DSMZ de Alemania. Ambas cepas fueron probadas contra patógenos comúnmente encontrados en superficies inertes de industrias y dispositivos médicos: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157:H7.

Primero se comprobó la capacidad adherente de las cepas probióticas a superficies inertes seleccionadas: polipropileno, cloruro de polivinilo, papel anti grasa, papel encerado, polietileno y cerámica. Ambas cepas demostraron capacidad adherente a estas superficies siendo el polietileno la superficie con mejores resultados.

Por otro lado, se realizaron ensayos en los que se consideró una muestra con biopelícula probiótica (ACT) y otra muestra control sin biopelícula, solo con los patógenos seleccionados (CNT). En estos ensayos, se tuvo en cuenta la carga celular de cada patógeno en ambas muestras.

Para *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*, se observó una reducción del crecimiento de ambos patógenos conforme aumentaba el tiempo de exposición a las biopelículas probióticas en comparación con el crecimiento en las muestras control. Además, hubo una reducción de entre 1 y 2 log CFU/cm². Sin embargo, para *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica*, la restricción de su crecimiento fue menor en comparación con el resto. En ambos, se observó una disminución de entre 0,5 y 1,5 log CFU/cm².

Este estudio también consta de una parte in vivo donde se probó la capacidad de control, por parte de probióticos, del crecimiento de patógenos en tejidos blandos de queso conservado polietileno. Como resultado, se observó que el biofilm formado por las cepas probióticas fue capaz de retrasar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 4 y 15°C hasta 3-4 días (figura 4.3).

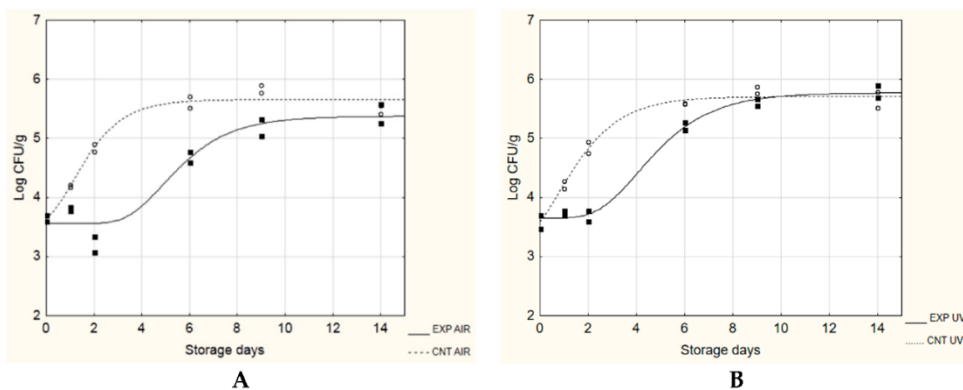


Figura 4.3. Evolución de *L. monocytogenes* durante el ensayo a 15 °C. Siendo EXP, quesos almacenados con biopelículas probióticas y CNT, quesos almacenados sin biofilm probiótico. (**A**), embalaje AIRE; (**B**), bajo envasado al vacío (UV) (adaptado de Speranza et al., 2020).

- **Desafío del biofilm: bacterias de ácido láctico aisladas de ubres bovinas versus estafilococos (realizado por Wallis et al., 2019)**

Wallis J.K. y su equipo con este estudio quisieron evaluar el posible uso de una biopelícula formada por bacterias de ácido láctico para controlar la mastitis causada por el patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC 12,600 en ganado bovino.

Para ello, se aislaron 5 cepas procedentes de la colección de cepas de la Facultad II, Departamento de Ingeniería de Bioprocesos y Microbiología de la Universidad de Artes y Ciencias Aplicadas de Hannover, Alemania. Todas las cepas aisladas y utilizadas para este estudio pertenecían al género *Lactobacillus* (L.): *L. rhamnosus* ATCC 7469, *L. plantarum* 2/37, *L. brevis* 104/37, *L. plantarum* 118/37 y *L. plantarum* 6E.

Se realizaron ensayos de biopelícula en una placa con 96 pocillos donde, en primer lugar, *Staphylococcus aureus* ATCC 12,600 y otras dos cepas de estafilococos presentes en rebaños bovinos, formaron una biopelícula. Una vez formadas las biopelículas de estos microorganismos, se inocularon las 5 cepas de bacterias de ácido láctico para que pudieran formar una biopelícula protectora e impedir el crecimiento de las cepas patógenas reemplazando al mismo tiempo la biopelícula constituida por microorganismos patógenos por una biopelícula compuesta por cepas probióticas.

Los resultados se cuantificaron raspando las biopelículas formadas y diluyéndolas hasta 10 veces para poder hacer un recuento en placas con caldo de cultivo MRS. Además, hubo una muestra control para cada cepa utilizada en este estudio.

En la figura 4.4 se puede ver como la cepa *L. rhamnosus* ATCC 7469 es la que mayores valores de crecimiento presenta conforme aumenta el tiempo de cultivo tanto en la muestra control como en la muestra con biopelícula. Sin embargo, la cepa *L. plantarum* 2/37 muestra crecimiento a partir de las 120 horas de exposición en la muestra control y en la muestra de desafío. Además, se observa un leve crecimiento de *S. aureus* a las 72 horas en la muestra con biopelícula como consecuencia a la inactividad de *L. plantarum* 2/37 hasta las 120 horas de exposición. El resto de cepas

probióticas, mostraron inhibición del crecimiento de *S. aureus* pero no fueron capaces de formar una biopelícula reemplazable. Wallis J.K. y su equipo sugieren que esto pudo deberse al método de cuantificación de cultivo empleado en este estudio.

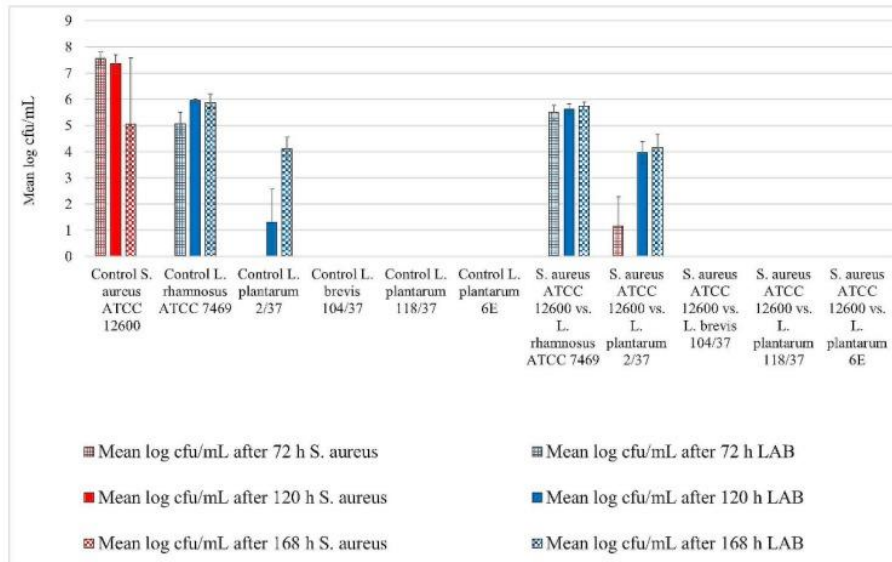


Figura 4.4. Resultados del ensayo de biopelículas de bacterias del ácido láctico (LAB) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 12,600 a las 72, 120 y 168 horas (adaptado de Wallis et al., 2019).

Estos resultados plantean a las cepas *L. rhamnosus* ATCC 7469 y *L. plantarum* 2/37 como candidatas idóneas para controlar la mastitis de ganados bovinos en un futuro a pesar de que *L. plantarum* 2/37 tenga un crecimiento más lento.

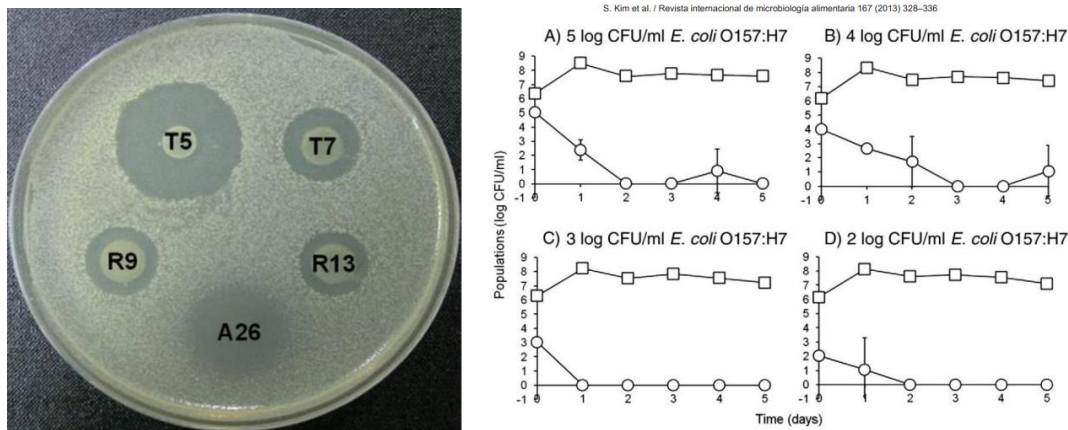
- **Inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 en acero inoxidable tras la exposición a biopelículas de *Paenibacillus polymyxa* (realizado por Kim et al., 2013)**

Se aislaron 5 cepas con características probióticas de brotes y semillas vegetales para reducir e inactivar a uno de los patógenos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos en industrias alimentarias: *Escherichia coli* O157:H7.

Las 5 cepas aisladas fueron las siguientes: T5 (*Paenibacillus polymyxa*), R9, R13 y T7 (cepas del género *Paenibacillus* sp.) y A23 (*Bacillus subtilis*). De todas ellas, la cepa

que mostró una mayor capacidad inhibitoria en el ensayo de doble capa realizado para *Escherichia coli* O157:H7 fue la cepa T5 (*Paenibacillus polymyxa*).

En la figura 4.5, se puede ver que el halo de inhibición más grande fue el de la cepa T5 tras 24 horas a 25°C en una placa de TSA.



Figuras 4.5 y 4.6. Actividad antimicrobiana de 5 cepas aisladas de brotes y semillas vegetales (T5 (*Paenibacillus polymyxa*), R9, R13 y T7 (cepas del género *Paenibacillus* sp.) y A23 (*Bacillus subtilis*)) en placa TSA tras 24 horas (fig. 10, izquierda). Poblaciones de células de *P. polymyxa* cepa T5 (□) y *E. coli* O157:H7 (•) cocultivadas en TSB a 25°C durante 5 días a concentraciones de *E. coli* O157:H7 diferentes: 5, 4, 3 y 2 log CFU/ml (A,B,C,D respectivamente) (fig. 11, derecha) (adaptado de Kim et al., 2013).

En este estudio, también se midió la capacidad de inhibición de la cepa T5 en un cocultivo con *Escherichia coli* O157:H7 (figura 4.6). El cocultivo se realizó en TSB a 25° durante 5 días como máximo y se midió la capacidad inhibitoria a distintas concentraciones: 2, 3,4 y 5 log CFU/ml. Se pudo ver cómo la población inicial de *Escherichia coli* O157:H7 y de la cepa T5 era de entre 6,2 y 6,4 log CFU/ml y, conforme fue aumentando el tiempo, la población de la cepa T5 aumentó hasta 8,5 log CFU/ml y la población de la cepa *Escherichia coli* O157:H7 disminuyó progresivamente a los 1-2 días hasta alcanzar el valor de 0 log CFU/ml.

Por otro lado, se midió la capacidad de inhibir a *Escherichia coli* O157:H7 de biopelículas formadas por T5 en superficies de acero inoxidable cuando estas se añaden a cultivos de *Escherichia coli* O157:H7. Para ello, se consideró una muestra control de *Escherichia coli* O157:H7 en acero inoxidable sin biopelícula probiótica y

una muestra con la biopelícula formada por T5. Los resultados fueron favorables ya que se produjo una reducción de la población del patógeno de hasta 1,5 y 2 log CFU/ml cuando este fue cultivado a 6 log CFU/ml (figura 4.7).

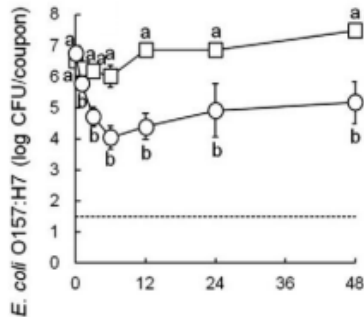


Figura 4.7. Reducción en la población de *E. coli* O157:H7 inoculada a 6 log CFU/cupón en acero inoxidable con (●) o sin (□) biopelículas de *P. polymyxa*, cepa T5 (adaptado de Kim et al., 2013).

Estos resultados sugieren que la cepa *Paenibacillus polymyxa* puede utilizarse para controlar a *Escherichia coli* O157:H7 y así evitar la contaminación cruzada que desencadena en enfermedades transmitidas por los alimentos.

- **Biopelículas de bacterias ácido lácticas no iniciadoras: un medio para controlar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso blando (realizado por Speranza et al., 2009)**

Con este estudio, se busca en primer lugar, ver la capacidad formadora de biopelículas de las cepas de bacterias del ácido láctico *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus aureus* y *Lactobacillus paracasei* sobre superficies de acero inoxidable. Efectivamente, todas las cepas fueron capaces de formar biopelículas en acero inoxidable pero un cóctel de todas ellas mostró una adherencia mayor.

Por otro lado, se elaboraron quesos experimentales con el coctel de las cepas de bacterias del ácido láctico y se inocularon con *Listeria monocytogenes*.

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de la biopelícula formada por las cinco cepas, anteriormente mencionadas, de controlar y reducir el crecimiento de

Listeria monocytogenes en quesos conservados en superficies de acero inoxidable; ya que este patógeno es muy común en leche pasteurizada que se utiliza para la elaboración de estos quesos y, por ende, puede propagarse en los productos elaborados y causar enfermedades.

Por un lado, se consideró una muestra control de quesos experimentales sin biopelícula expuestos a *Listeria monocytogenes* y, por otro lado, una muestra experimental de quesos con biopelículas formadas por bacterias de ácido láctico expuestos también a *Listeria monocytogenes*. Ambas muestras fueron conservadas durante 28 días a 4°C. El resultado de este estudio fue favorable para las cepas de *Lactobacillus sp.* formadoras de la biopelícula ya que consiguieron reducir hasta 1 log CFU/ml la población de *Listeria monocytogenes* en los quesos experimentales en comparación con la muestra control tal y como se muestra en la curva de crecimiento de la figura 4.8.

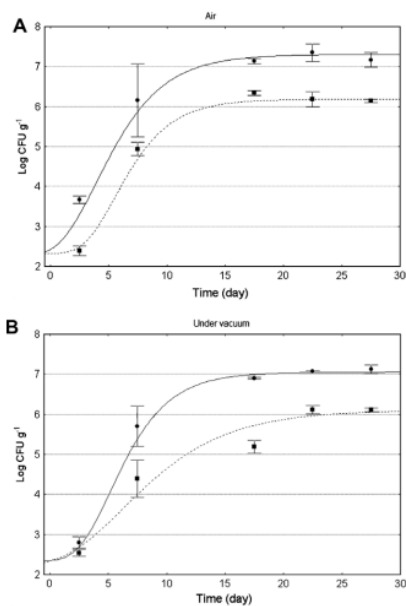


Figura 4.8. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en quesos blandos con biopelícula formada por cóctel de *Lactobacillus sp.* y en quesos blandos sin biopelícula (control); envasados al aire (A) y al vacío (B). Línea continua: muestra control; línea discontinua: muestra experimental (adaptado de Speranza et al., 2009).

Speranza E. y su equipo pudieron concluir con estos resultados que las cepas de *Lactobacillus sp.* son excelentes candidatos para controlar la propagación de patógenos como *Listeria monocytogenes* causantes de diversas enfermedades transmitidas por los alimentos en la industria alimentaria. Aun así, también dejaron claro que son necesarios más estudios al respecto.

- **Biopelículas de bacterias del ácido láctico y su capacidad para mitigar la colonización superficial de *Escherichia coli* O157:H7 (realizado por Cisneros et al., 2021).**

El propósito de este estudio fue probar la eficacia de frenar el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 por parte de biopelículas formadas por cepas de bacterias del ácido láctico. Se aislaron 100 cepas y se evaluó su capacidad de inhibición y de adhesión a superficies comunes de procesadoras de carne donde este patógeno es muy común. De las cepas aisladas, 37 mostraron inhibición y 18 mostraron adhesión a superficies inertes propias de la industria alimentaria de carnes. De las 18 cepas, se consideraron las más efectivas 5: *Lactiplantibacillus plantarum* CRL 1075, *Lactiplantibacillus plantarum* CRL 1482, *Lactiplantibacillus plantarum* CRL 683, *Pediococcus pentosaceus* CRL 2145 y *Pediococcus pentosaceus* CRL 908.

Una vez consideradas las cepas para el estudio de la inhibición del patógeno *Escherichia coli* O157:H7, se realizaron ensayos de inhibición en microplacas de polietileno y en medios a base de carne a 10°C durante 24 horas de exposición del patógeno a las biopelículas ya formadas. Los resultados fueron favorables para todas las cepas pero en particular la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* CRL 1075 fue la que mayor capacidad de inhibición mostró frente a *Escherichia coli* O157:H7. Además, fue la única cepa que aumentó su población en presencia del patógeno. En la figura 4.9, se pueden observar los resultados de los ensayos realizados. Como muestra control, se dejó crecer *Escherichia coli* O157:H7 en ausencia de biopelículas protectoras y, por otro lado, la formación de las biopelículas de bacterias del ácido láctico sin exposición al patógeno se tomó como muestra control del experimento.

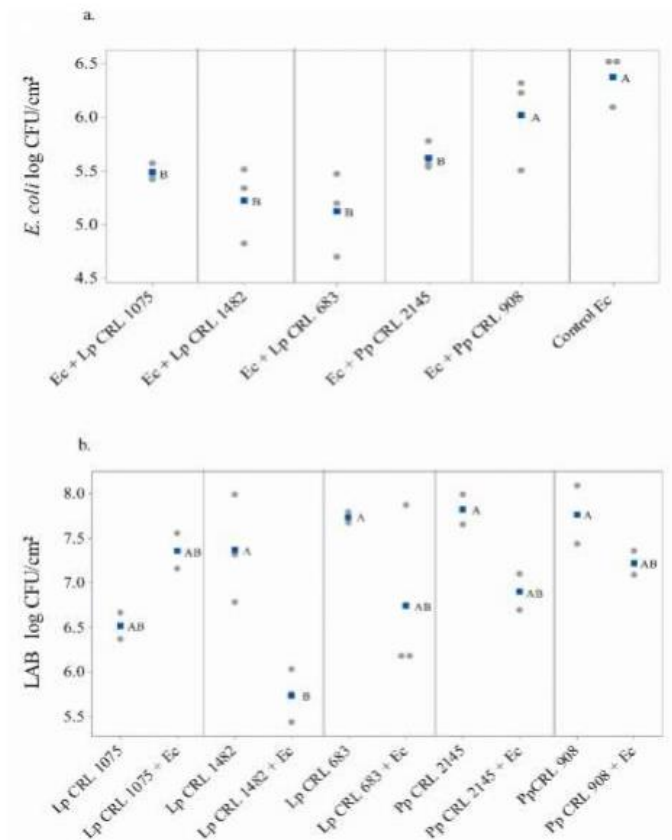


Figura 4.9. Gráfica de dispersión de los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 por parte de biopelículas formadas por bacterias del ácido láctico a 10°C en un medio a base de carne durante 24 horas en microplacas de polietileno. A) Recuento de células de *Escherichia coli* O157:H7 en ausencia de biopelículas (muestra control) o presencia de biopelículas de las cepas *Lactiplantibacillus plantarum* CRL 1075, *Lactiplantibacillus plantarum* CRL 1482, *Lactiplantibacillus plantarum* CRL 683, *Pediococcus pentosaceus* CRL 2145 y *Pediococcus pentosaceus* CRL 908. B) Recuento de las células de las cepas de bacterias del ácido láctico (log UFC/cm²) una vez formadas las biopelículas por sí solas (control) y expuestas a *Escherichia coli* O157:H7. Los cuadrados representan el valor medio del recuento y los puntos cada valor independiente, Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$) (adaptado de Cisneros et al., 2021).

Una vez realizados los recuentos y comparándolos con las muestras control, se propuso como cepa de control biológico la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* CRL 1075. Este estudio resulta innovador ya que prueba la eficacia de inhibición a 10°C, la

temperatura a la cual se conserva la carne; mientras que otros estudios lo han hecho a la temperatura idónea del crecimiento de las bacterias probióticas (30°C).

- **Estudios realizados in vivo**

- **Formación y Caracterización de Biopelículas Bacterianas Tempranas en Diferentes Tipologías de Madera Aplicadas en Producción Láctea (realizado por Cruciata et al., 2018)**

Gracias a estudios como este, se ha visto que las bacterias de ácido láctico presentes en el suero de la leche utilizada para la elaboración de quesos, pueden formar biopelículas estables en las cubas de madera donde se almacena. Estas biopelículas pueden prevenir el crecimiento de patógenos comunes en la leche como *Escherichia coli* ATCC 35150, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 o *Staphylococcus aureus* ATCC 33862.

Para comprobar esta afirmación se realizó una prueba de contaminación artificial en cubas de 15 litros de capacidad hechas con 7 tipos de madera diferentes para ver si el tipo de madera afectaba a la formación de biofilm. De manera que realizaron 8 ensayos, un ensayo control con cubas de castaño de Clabaria (material más utilizado en las procesadoras) y 7 ensayos con cubas hechas con madera de castaño de Sicilia, cedro, cerezo, fresno, nogal, maderas de pino negro y chopo.

En primer lugar las cubas fueron lavadas con tratamiento de agua caliente durante 30 días y se pusieron en contacto con el suero de leche con las bacterias de ácido láctico durante 7 días. Se recogieron astillas de la madera de la superficie interna de cada cuba con un bisturí y fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) donde se pudo ver el desarrollo de las poblaciones microbianas en la superficie interna de las cubas tras la exposición con el suero de leche y se detectó la formación de biofilm en todas (figura 4.10).

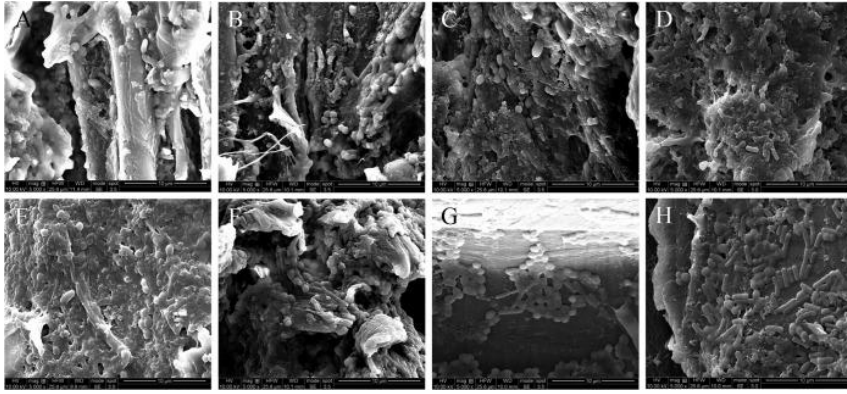


Figura 4.10. Observaciones de microscopía electrónica de barrido de astillas de madera después de la activación con suero en cubas hechas de castaño de Calabria (A), castaño de Sicilia (B), cedro (C), cereza (D), fresno (E), nogal (F), pino negro (G) y maderas de álamo (H) (adaptado de Cruciata et al., 2018).

Una vez formado el biofilm de bacterias del ácido láctico en las superficies de las cubas se aislaron y se identificaron cepas pertenecientes a los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Posteriormente, se realizó la contaminación artificial de las cubas para ver si los biofilm formados eran capaces de impedir la formación de biofilm patógenos y, en consecuencia, la contaminación del suero de leche. Se inoculó un cóctel de los patógenos principales de los productos lácteos (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) en dos cubas y otras dos cubas control con la solución del cóctel sin los patógenos. La contaminación artificial duró dos semanas y, una vez transcurridas no se observó crecimiento de los patógenos inoculados.

Cruciata y su equipo concluyeron que estos resultados pueden deberse a las condiciones ácidas generadas por las biopelículas formadas por bacterias del ácido láctico ya que en estado de biofilm sus propiedades aumentan aún más y son más efectivas como control de patógenos.

- **Control de *Listeria* spp. por Bacterias de Exclusión Competitiva en Desagües de Piso de una Planta Procesadora de Aves (realizado por Zhao et al., 2006).**

Este estudio fue uno de los primeros estudios en aplicar ensayos in vivo en desagües del suelo de plantas procesadoras de carne de aves. En los ensayos realizados, se aplican bacterias de ácido láctico incluidas en los productos de limpieza a base de enzimas utilizados durante 5 semanas. Con ello se pretende que las bacterias del ácido láctico formen una biopelícula protectora en los desagües y sean capaces de reducir la proliferación del patógeno *Listeria monocytogenes*, muy presente en este tipo de instalaciones. En definitiva, con este estudio se quiso probar la eficacia como biodesinfectante de dos cepas de bacterias del ácido láctico: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C-1-92 y *Enterococcus durans* 152.

En primer lugar, se clasificaron los lugares de muestreo de la planta procesadora en función de la temperatura, ubicación y el flujo del líquido con restos del procesado de la carne. Se clasificaron 6 desagües denominados como desagüe 1, 2, 3, 4, 6 y 8. Los desagües 1 y 2 se situaban cerca de las líneas de corte de carne, estaban hechos de fibra de vidrio y en un ambiente con temperatura de entre 11 y 16°C. El desagüe número 3 se ubicaba en medio de la planta procesadora a 15°C, en una zona con mucho tránsito y estaba hecho de metal. Los desagües 4 y 6 estaban compuestos de fibra de vidrio y situados en ambientes fríos a 2-3°C cerca de las zonas de empaquetamiento de la carne. Por último, el desagüe 8 se situaba en una zona con mucho tránsito de restos de sangre y carne con ambiente muy sucio, cerca de las zonas de extracción del hígado y los pulmones a 26°C.

Todos los desagües recibieron tratamiento a excepción del desagüe número 2 que se utilizó como control sin recibir tratamiento con las bacterias del ácido láctico.

Antes del tratamiento, se realizaban muestreos todas las semanas durante 10 semanas solamente utilizando los métodos de limpieza rutinarios en la planta procesadora. Los muestreos se realizaban en 5 zonas de cada desagüe en áreas de 10 x 10 cm: interior, lado derecho, lado izquierdo, parte inferior de la cubierta y fondo

del desagüe; con una esponja estéril. La esponja se diluyó con peptona para poder sembrar en placa y hacer un recuento de las poblaciones bacterianas existentes. Gracias a pruebas bioquímicas, se observó presencia de *Listeria* en todos los desagües: 7,5 log CFU/100 cm² en el desagüe 8; 4,9 log CFU/100 cm² en el desagüe 3; 4,4 log CFU/100 cm² en el desagüe 2 (control); 4,1 log CFU/100 cm² en el desagüe 4; 3,7 log CFU/100 cm² en el desagüe 1 y 3,6 log CFU/100 cm² en el desagüe 6 (ver tabla 4.1.).

A partir de la semana 10, se aplicó el tratamiento con las dos cepas de bacterias del ácido láctico durante 5 semanas de las cuales la primera se aplicó tras la limpieza rutinaria 4 veces a la semana y el resto de semanas solo se aplicaba el tratamiento dos veces a la semana. Cada dos semanas se recogían muestras y los resultados fueron favorables; ya que si pudo reducirse la población de *Listeria* presente en todos los desagües.

Tabla 4.1. Resultados de los muestreos realizados durante el estudio antes y después del tratamiento con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C-1-92 y *Enterococcus durans* 152 en la limpieza de los desagües (adaptado de Zhao et al., 2006).

Tiempo	Ubicación	<i>Listeria</i> sp. (log ₁₀ CFU/100 cm ²) para drenajes de piso [±]					
		Drenaje 1	Drenaje 3	Drenaje 4	Drenaje 6	Drenaje 8	Drenaje 2 (control) [±]
Antes del tratamiento CE [±]	Parte inferior de la cubierta	3,3 ± 0,8	4,2 ± 1,2	4,2 ± 1,1	4,2 ± 1,2	7,6 ± 1,1	4,2 ± 1,1
	Lado derecho del desagüe	3,9 ± 0,7	5,0 ± 0,9	4,3 ± 0,8	3,5 ± 1,9	7,6 ± 0,8	4,6 ± 0,7
	Lado izquierdo del desagüe	4,0 ± 1,0	4,4 ± 1,3	3,4 ± 1,1	3,2 ± 1,5	8,2 ± 0,5	4,1 ± 0,6
	dentro del drenaje	3,5 ± 0,8	5,4 ± 1,3	4,5 ± 1,1	3,6 ± 1,3	7,8 ± 0,9	5,4 ± 1,4
	Piso dentro de ca. 30 cm de desagüe	3,6 ± 0,9	5,3 ± 0,6	4,3 ± 1,4	3,3 ± 1,3	6,1 ± 1,9	3,8 ± 1,0
Después del tratamiento CE [±]	Parte inferior de la cubierta	1,8 ± 0,4 [±]	1,9 ± 0,3 [±]	1,9 ± 0,3 [±]	2,1 ± 0,4 [±]	4,0 ± 2,0 [±]	3,6 ± 0,3 [±]
	Lado derecho del desagüe	2,0 ± 0,5 [±]	2,1 ± 0,8 [±]	1,7 ± 0,1 [±]	1,9 ± 0,7 [±]	3,9 ± 2,0 [±]	4,0 ± 0,6 [±]
	Lado izquierdo del desagüe	2,0 ± 0,6 [±]	2,3 ± 0,6 [±]	2,1 ± 1,2 [±]	1,9 ± 0,4 [±]	3,9 ± 2,2 [±]	4,6 ± 0,7 [±]
	dentro del drenaje	2,0 ± 0,5 [±]	2,8 ± 1,4 [±]	1,7 ± 0,1 [±]	2,0 ± 0,7 [±]	3,7 ± 1,8 [±]	5,5 ± 1,2 [±]
	Piso dentro de ca. 30 cm de desagüe	1,9 ± 0,5 [±]	2,1 ± 0,6 [±]	2,1 ± 0,9 [±]	1,9 ± 0,6 [±]	3,5 ± 0,8 [±]	4,1 ± 1,5 [±]

Hay que destacar que la eficacia del tratamiento se ve influenciada por la temperatura, el tránsito, la composición del desagüe y la cantidad de líquido circundante por el mismo. Por ejemplo, el desagüe número 6 fue en el que mayor reducción de *Listeria* se observó. Zhao y colaboradores dedujeron que pudo deberse a las condiciones de temperatura; ya que este desagüe estaba situado en una zona de refrigeración con poco tránsito y la población de *Listeria* pasó a ser indetectable en la mayoría de las zonas de muestreo a la semana 16 del ensayo (figura 16). Por otro lado, debido a las

condiciones de suciedad y temperatura del desagüe número 8, el tratamiento empezó a ser eficaz mucho más tarde y *Listeria* aún seguía presente después del tratamiento pero en menor cantidad.

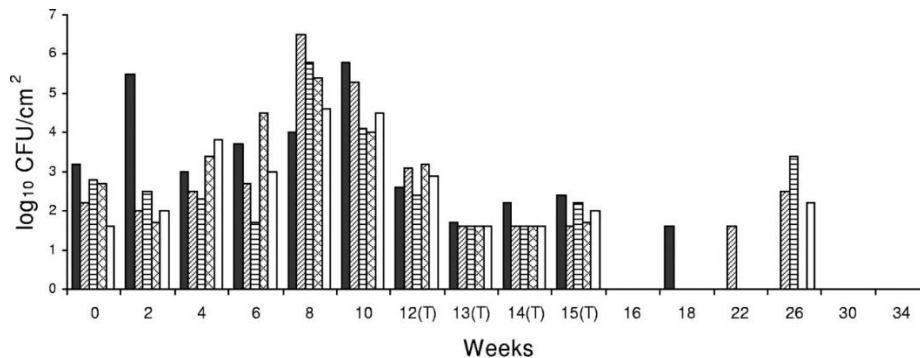


Figura 4.11. Presencia de *Listeria* en el desagüe número 6 durante todo el ensayo antes y después del tratamiento. Lado inferior de la cubierta; ▨, lado derecho del desagüe; ▩, lado izquierdo del desagüe; ▧, dentro del desagüe; □, piso dentro de ca. 30 cm del desagüe. (T), tratamiento aplicado (adaptado de Zhao et al., 2006).

Gracias a estudios como este, se puede plantear la idea de utilizar probióticos como biodesinfectantes para controlar la proliferación de cepas patógenas como *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria.

• Discusión

En este trabajo se busca exponer la eficacia de la aplicación de biopelículas formadas por microorganismos probióticos para prevenir, controlar e incluso inhibir el crecimiento y proliferación de microorganismos patógenos.

Para ello, se ha elaborado una revisión bibliográfica de estudios realizados tanto in vitro como in vivo. En estos estudios se utilizan cepas de bacterias del ácido láctico capaces de formar biopelículas para competir por los nutrientes de los sitios de adhesión de biopelículas patógenas mediante el mecanismo de exclusión competitiva.

Los resultados de los estudios de esta revisión, avalan las estrategias que proponen la aplicación de microorganismos probióticos para el control de patógenos como una alternativa eficaz y novedosa; puesto que en todos los estudios analizados las cepas

utilizadas son capaces de reducir el crecimiento de los patógenos. De todas las cepas utilizadas, las cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* son las más estudiadas y eficaces en los estudios evaluados.

En la tabla 4.2 se resumen los resultados de los estudios seleccionados para la realización de esta revisión.

Tabla 4.2. Resumen de los resultados de los estudios analizados en esta revisión. Fuente: elaboración propia.

Estudio	Resultado
In vitro	In vitro
<p>Desarrollo de biopelículas probióticas tolerantes a la desecación que inhiben el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos en superficies de acero inoxidable (realizado por Kim et al., 2022)</p>	<p>Biopelículas formadas por las cepas <i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Pediococcus pentosaceus</i> aisladas de alimentos, mostraron efecto inhibitorio contra <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Bacillus cereus</i> y <i>Salmonella entérica</i>.</p>
<p>Uso de posibles biopelículas de bacterias probióticas del ácido láctico (LAB) para el control de la formación de biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Salmonella Typhimurium</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (realizado por Caballero Gómez et al., 2016)</p>	<p>Las biopelículas formadas por las cepas <i>Lactobacillus curvatus</i>, <i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Lactococcus lactis</i> aisladas de alimentos, fueron las más efectivas contra <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Salmonella Typhimurium</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7</p>

<p>Evaluación del Potencial de formación de Biopelículas de <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> y <i>Lactobacillus reuteri</i> como agentes competitivos de biocontrol frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos (realizado por Speranza et al., 2020)</p>	<p>Las cepas <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> y <i>Lactobacillus reuteri</i>, aisladas de alimentos, reducen la población de <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella entérica</i>. Hubo una mayor reducción en <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>
<p>Desafío del biofilm: bacterias de ácido láctico aisladas de ubres bovinas versus estafilococos (realizado por Wallis et al., 2019)</p>	<p>Biopelículas de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>, aisladas de alimentos, fueron las más efectivas para el control de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>
<p>Inactivación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en acero inoxidable tras la exposición a biopelículas de <i>Paenibacillus polymyxa</i> (realizado por Kim et al., 2013)</p>	<p>Una biopelícula formada por <i>Paenibacillus polymyxa</i> (aislada de semillas y brotes vegetales) fue capaz de reducir hasta 1,5 y 2 log CFU/cm² la población de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en acero inoxidable.</p>
<p>Biopelículas de bacterias ácido lácticas no iniciadoras: un medio para controlar el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso blando (realizado por Speranza et al., 2009)</p>	<p>Biopelícula formada por caldo de 5 cepas de <i>Lactobacillus</i> (recogidas de colección propia) redujo hasta 1 log CFU/cm² la población de <i>Listeria monocytogenes</i> en 28 días.</p>
<p>Biopelículas de bacterias del ácido láctico y su capacidad para mitigar la colonización superficial de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (realizado por Cisneros et al., 2021).</p>	<p>Biopelículas de <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> aisladas de alimentos mostraron un efecto inhibitor de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 mayor que <i>Pediococcus pentosaceus</i>.</p>

In vivo	In vivo
Formación y Caracterización de Biopelículas Bacterianas Tempranas en Diferentes Tipologías de Madera Aplicadas en Producción Láctea (realizado por Cruciata et al., 2018)	No hubo crecimiento de los patógenos <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> tras la contaminación artificial debido a las condiciones ácidas generadas por las bacterias del ácido láctico presentes en la leche pasteurizada.
Control de <i>Listeria</i> spp. por Bacterias de Exclusión Competitiva en Desagües de Piso de una Planta Procesadora de Aves (realizado por Zhao et al., 2006).	<i>Lactococcus lactis</i> y <i>Enterococcus durans</i> (recogidas de colección propia) mostraron actividad inhibitora al formar una biopelícula que frenó el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> tras utilizarse inoculadas en desinfectantes de desagües de pisos de una planta procesadora de aves a las 5 semanas.

5. Conclusión

La aplicación de microorganismos probióticos como estrategia de control frente a patógenos está siendo cada vez más estudiada y supone una nueva línea de investigación. Esto es debido a la resistencia que están presentando los microorganismos patógenos a los métodos de control que normalmente se utilizan ya que cuando los microorganismos se encuentran formando una biopelícula son aún más resistentes a las condiciones de estrés (Barzegari et al., 2020).

Gracias a los artículos revisados, se puede afirmar que el uso de probióticos como control de patógenos es efectivo ya que en la mayoría de estudios hay una reducción de hasta 2 log CFU/cm² de las poblaciones de patógenos. Además, se puede destacar que las cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* son las más eficientes inhibiendo el crecimiento de la población de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* o *Salmonella*.

A pesar de ello, esta alternativa necesita más estudios al respecto para poder aplicarse en un futuro.

6. Bibliografía

1. ALORI, E. T., & BABALOLA, O. O. (2018). "Microbial Inoculants for Improving Crop Quality and Human Health in África". *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02213>
2. BARZEGARI, A., KHEYROLAHZADEH, K., HOSSEINIYAN KHATIBI, S. M., SHARIFI, S., MEMAR, M. Y., & ZUNUNI VAHED, S. (2020). "The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms". *Infection and drug resistance*, 13, 659–672. <https://doi.org/10.2147/IDR.S232982>
3. BINDA, S., HILL, C., JOHANSEN, E., OBIS, D., POT, B., SANDERS, M. E., TREMBLAY, A., & OUWEHAND, A. C. (2020). "Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements". *Frontiers in microbiology*, 11, 1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
4. CALVO CRESPO. H (2020). *Biocontrol de podredumbres en frutas por Bacillus Amyloliquefaciens BUZ-14*, Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria – Universidad de Zaragoza.
5. CARPENTIER, B., & CERF, O. (2011). "Review--Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises". *International journal of food microbiology*, 145(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>
6. CASTAÑEDA GUILLOT, CARLOS. (2018). "Probióticos, puesta al día: an update". *Revista Cubana de Pediatría*, 90(2), 286-298.
7. CISNEROS, L., CATTELAN, N., VILLALBA, M., RODRIGUEZ, C. L., SERRA, D. O., YANTORNO, O., & FADDA, S. (2021). "Lactic acid bacteria biofilms and

- their ability to mitigate *Escherichia coli* O157:H7 surface colonization". *Letters in Applied Microbiology*, 73(2), 247-256. <https://doi.org/10.1111/lam.13509>
8. CRUCIATA, M., GAGLIO, R., SCATASSA, M. L., SALA, G., CARDAMONE, C., PALMERI, M., MOSCHETTI, G., LA MANTIA, T., & SETTANNI, L. (2018). "Formation and Characterization of Early Bacterial Biofilms on Different Wood Typologies Applied in Dairy Production". *Applied and environmental microbiology*, 84(4), e02107-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02107-17>
 9. CZERUCKA, D., PICHE, T., & RAMPAL, P. (2007). "Review article: yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii*". *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(6), 767–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
 10. DOBSON, A., COTTER, P. D., ROSS, R. P., & HILL, C. (2012). "Bacteriocin production: a probiotic trait?" *Applied and environmental microbiology*, 78(1), 1–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.05576-11>
 11. EIJSINK, V. G. H., AXELSSON, L., DIEP, D. B., HÅVARSTEIN, L. S., HOLO, H., & NES, I. F. (2002). "Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication". *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1023/a:1020582211262>
 12. ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., & ISHIZAKI, A. (2000). "Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity". *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 85–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x>
 13. FREIMOSER, F. M., RUEDA-MEJIA, M. P., TILOCCA, B., & MIGHELI, Q. (2019). "Biocontrol yeasts: mechanisms and applications". *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(10), 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>

14. GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., BENOMAR, N., & LUCAS, R. (2010). "Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol". *Current opinion in biotechnology*, 21(2), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.005>
15. GANDHI, M., & CHIKINDAS, M. L. (2007). "Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive". *International journal of food microbiology*, 113(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008>
16. GARGI A., SENGUN I. Y. (2021). "Marination liquids enriched with probiotics and their inactivation effects against food-borne pathogens inoculated on meat", *Meat Science*, Volume 182, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108624>.
17. GARRITY, GEORGE M., PARKER, CHARLES T., & TINDALL, BRIAN J. (2019). "International code of nomenclature of prokaryotes". *United States*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>
18. GIRAFFA, G., CHANISHVILI, N., & WIDYASTUTI, Y. (2010). "Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology". *Research in microbiology*, 161(6), 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>
19. GÓMEZ, N. C., RAMIRO, J. M. P., QUECÁN, B. X. V., & DE MELO FRANCO, B. D. G. (2016). "Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation". *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00863>
20. GROSU-TUDOR, S., STANCU, M. M., PELINESCU, D., & ZAMFIR, M. (2014). "Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30(9), 2459-2469. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1671-7>
21. GUERRIERI, E. (2008, 14 noviembre). "Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model". *Science Direct*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.11.001>

22. HABSCHIED, K., KRSTANOVIĆ, V., ZDUNIĆ, Z., BABIĆ, J., MASTANJEVIĆ, K., & ŠARIĆ, G. K. (2021). "Mycotoxins Biocontrol Methods for Healthier Crops and Stored Products". *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(5), 348. <https://doi.org/10.3390/jof7050348>
23. HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R. B., FLINT, H. J., SALMINEN, S., CALDER, P. C., & SANDERS, M. E. (2014). "Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic". *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
24. INTERNATIONAL CODE OF NOMENCLATURE OF PROKARYOTES. (2019). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(1A), S1–S111. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>
25. JW COSTERTON (1995). "Overview of microbial biofilms". *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 15, número 3, 137–140, <https://doi.org/10.1007/BF01569816>
26. KHANEGHAH M.A. (2020). "Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review". *Trends in Food Science & Technology*, Volume 95, Pages 205-218, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.022>
27. KIM, J. H., LEE, E. S., SONG, K. J., KIM, B. M., HAM, J. S., & OH, M. H. (2022). "Development of Desiccation-Tolerant Probiotic Biofilms Inhibitory for Growth of Foodborne Pathogens on Stainless Steel Surfaces". *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(6), 831. <https://doi.org/10.3390/foods11060831>
28. KIM, S., BANG, J., KIM, H., BEUCHAT, L. R., & RYU, J. H. (2013). "Inactivation of Escherichia coli O157:H7 on stainless steel upon exposure to Paenibacillus polymyxa biofilms". *International journal of food microbiology*, 167(3), 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.004>

29. KLEEREBEZEM M. (2004). "Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis". *Peptides*, 25(9), 1405–1414. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.10.021>
30. LASA, I., POZO, J. L. DEL, PENADÉS, J. R., & LEIVA, J. (2005). "Biofilms bacterianos e infección". *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163-175 https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002
31. LAZO-VÉLEZ, M. A., SERNA-SALDÍVAR, S. O., ROSALES-MEDINA, M. F., TINOCO-ALVEAR, M., & BRIONES-GARCÍA, M. (2018). "Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review". *Journal of applied microbiology*, 125(4), 943–951. <https://doi.org/10.1111/jam.14037>
32. M.B. IGLESIAS, I. VIÑAS, P. COLÁS-MEDÀ, C. COLLAZO, J.C.E. SERRANO, M. ABADIAS (2017). "Adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes* and interaction with *Lactobacillus rhamnosus* GG after habituation on fresh-cut pear". *Journal of Functional Foods*, Volume 34, pp 453-460, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.011>.
33. MAFU A.A., ROY D., GOULET J., MAGNY P. (1990). "Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel, Glass, Polypropylene, and Rubber Surfaces After Short Contact Times". *Journal of Food Protection*, Volume 53, Issue 9, pp 742-746 <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.9.742>.
34. MAHANTY, T., BHATTACHARJEE, S., GOSWAMI, M., BHATTACHARYYA, P., DAS, B., GHOSH, A., & TRIBEDI, P. (2017). "Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development". *Environmental science and pollution research international*, 24(4), 3315–3335. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
35. MEMAR, M. Y., SAADAT, Y. R., HEJAZIAN, S. M., ARDALAN, M., AHMADIAN, E., & VAHED, S. Z. (2022). "Probiotics Action Against Biofilms". *Springer series on biofilms* (pp. 99-125). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-031-10992-8_5

36. MOLL, G. N., KONINGS, W. N., & DRIESSEN, A. J. (1999). "Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation". *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 185–198.
37. PARTE, A. (2018). LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(6), 1825-1829. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>
38. PULIGUNDLA, P. (s. f.-b). "Biocontrol Approaches against Escherichia coli O157:H7 in Foods". MDPI. <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/5/756>
39. RATHER, M. A., GUPTA, K., & MANDAL, M. (2021). "Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies". *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 52(4), 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
40. REGULATION, E. C. (2007). N° 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of the European Union*, 12, 3-18.
41. REUBEN, R. C., ROY, P. C., SARKAR, S. L., RUBAYET UL ALAM, A. S. M., & JAHID, I. K. (2020). "Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties". *Journal of dairy science*, 103(2), 1223–1237. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17092>
42. RUIZ, M. Á. M., COLELLO, R., PADOLA, N. L., & ETCHEVERRÍA, A. I. (2017). "Efecto inhibitorio de Lactobacillus spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos". *Revista Argentina De Microbiología*, 49(2), 174-177. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>
43. SADEGHI, A. (2022, octubre). "Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities". *Science Direct*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.08.018>

46. SANJUÁN, J., NÁPOLES, M. C., PÉREZ-MENDOZA, D., LORITE, M. J., & RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N. (2023). "Microbials for Agriculture: Why Do They Call Them Biostimulants When They Mean Probiotics?". *Microorganisms*, 11(1), 153. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010153>
45. SPERANZA, B., LISO, A., RUSSO, V., & CORBO, M. R. (2020). "Evaluation of the Potential of Biofilm Formation of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and *Lactobacillus reuteri* as Competitive Biocontrol Agents Against Pathogenic and Food Spoilage Bacteria". *Microorganisms*, 8(2), 177. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020177>
46. SPERANZA, B., SINIGAGLIA, M., & CORBO, M. R. (2009). "Non starter lactic acid bacteria biofilms: A means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese". *Food Control*, 20(11), 1063-1067. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.01.006>
47. STANISZEWSKI, A., & KORDOWSKA-WIATER, M. (2021). "Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts-Characteristics and Food Application". *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1306. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>
48. TOMÉ, A. R., CARVALHO, F. M., TEIXEIRA-SANTOS, R., BURMØLLE, M., MERGULHÃO, F. J. M., & GOMES, L. C. (2023). "Use of Probiotics to Control Biofilm Formation in Food Industries". *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(4), 754. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040754>
49. VANDENPLAS, Y., HUYS, G., & DAUBE, G. (2015). "Probiotics: an update". *Jornal de pediatria*, 91(1), 6–21. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2014.08.005>
50. VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., & VERSTRAETE, W. (2000). "Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture". *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 64(4), 655–671. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000>

51. WALLIS, J. K., KRÖMKER, V., & PADUCH, J. H. (2019). "Biofilm Challenge: Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Udders versus Staphylococci". *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(2), 79. <https://doi.org/10.3390/foods8020079>
52. ZHAO, T. (2004, 1 julio). "Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms". *American Society of Microbiology*.
53. ZHAO, T., PODTBURG, T. C., ZHAO, P., SCHMIDT, B. E., BAKER, D., CORDS, B. R., & DOYLE, M. P. (2006b). "Control of *Listeria* spp. by Competitive-Exclusion Bacteria in Floor Drains of a Poultry Processing Plant". *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3314-3320. <https://doi.org/10.1128/aem.72.5.3314-3320.2006>
54. ZHAO, X., ZHAO, F., WANG, J., & ZHONG, N. (2017). "Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives". *RSC Advances*, 7(58), 36670-36683. <https://doi.org/10.1039/c7ra02497e>

6.1. Referencias de imágenes y tablas

- **Tablas**

Tablas 1.1, 1.2, 3.1 y 4.2. Elaboración propia.

Tabla 4.1. ZHAO, T., PODTBURG, T. C., ZHAO, P., SCHMIDT, B. E., BAKER, D., CORDS, B. R., & DOYLE, M. P. (2006b). "Control of *Listeria* spp. by Competitive-Exclusion Bacteria in Floor Drains of a Poultry Processing Plant". *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3314-3320. <https://doi.org/10.1128/aem.72.5.3314-3320.2006>

- **Figuras**

Figura 1.1. BINDA, S., HILL, C., JOHANSEN, E., OBIS, D., POT, B., SANDERS, M. E., TREMBLAY, A., & OUWEHAND, A. C. (2020). "Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements". *Frontiers in microbiology*, 11, 1662.

Figura 1.2. DOBSON, A., COTTER, P. D., ROSS, R. P., & HILL, C. (2012). “Bacteriocin production: a probiotic trait?” *Applied and environmental microbiology*, 78(1), 1–6.

Figura 1.3. BARZEGARI, A., KHEYROLAHZADEH, K., HOSSEINIYAN KHATIBI, S. M., SHARIFI, S., MEMAR, M. Y., & ZUNUNI VAHED, S. (2020). “The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms”. *Infection and drug resistance*, 13, 659–672.

Figura 1.4. FREIMOSER, F. M., RUEDA-MEJIA, M. P., TILOCCA, B., & MIGHELI, Q. (2019). “Biocontrol yeasts: mechanisms and applications”. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(10), 154.

Figura 1.5. ALORI, E. T., & BABALOLA, O. O. (2018). “Microbial Inoculants for Improving Crop Quality and Human Health in África”. *Frontiers in Microbiology*, 9.

Figura 4.1. KIM, J. H., LEE, E. S., SONG, K. J., KIM, B. M., HAM, J. S., & OH, M. H. (2022). “Development of Desiccation-Tolerant Probiotic Biofilms Inhibitory for Growth of Foodborne Pathogens on Stainless Steel Surfaces”. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(6), 831.

Figura 4.2. GÓMEZ, N. C., RAMIRO, J. M. P., QUECÁN, B. X. V., & DE MELO FRANCO, B. D. G. (2016). “Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation”. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00863>

Figura 4.3. SPERANZA, B., LISO, A., RUSSO, V., & CORBO, M. R. (2020). “Evaluation of the Potential of Biofilm Formation of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and *Lactobacillus reuteri* as Competitive Biocontrol Agents Against Pathogenic and Food Spoilage Bacteria”. *Microorganisms*, 8(2), 177.

Figura 4.4. WALLIS, J. K., KRÖMKER, V., & PADUCH, J. H. (2019). “Biofilm Challenge: Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Udders versus *Staphylococci*”. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(2), 79.

Figuras 4.5, 4.6 y 4.7. KIM, S., BANG, J., KIM, H., BEUCHAT, L. R., & RYU, J. H. (2013). "Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel upon exposure to *Paenibacillus polymyxa* biofilms". *International journal of food microbiology*, 167(3), 328–336.

Figura 4.8. SPERANZA, B., SINIGAGLIA, M., & CORBO, M. R. (2009). "Non starter lactic acid bacteria biofilms: A means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese". *Food Control*, 20(11), 1063-1067.

Figura 4.9. CISNEROS, L., CATTELAN, N., VILLALBA, M., RODRIGUEZ, C. L., SERRA, D. O., YANTORNO, O., & FADDA, S. (2021). "Lactic acid bacteria biofilms and their ability to mitigate *Escherichia coli* O157:H7 surface colonization". *Letters in Applied Microbiology*, 73(2), 247-256.

Figura 4.10. CRUCIATA, M., GAGLIO, R., SCATASSA, M. L., SALA, G., CARDAMONE, C., PALMERI, M., MOSCHETTI, G., LA MANTIA, T., & SETTANNI, L. (2018). "Formation and Characterization of Early Bacterial Biofilms on Different Wood Typologies Applied in Dairy Production". *Applied and environmental microbiology*, 84(4), e02107-17.

Figura 4.11. ZHAO, T., PODTBURG, T. C., ZHAO, P., SCHMIDT, B. E., BAKER, D., CORDS, B. R., & DOYLE, M. P. (2006b). "Control of *Listeria* spp. by Competitive-Exclusion Bacteria in Floor Drains of a Poultry Processing Plant". *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3314-3320.
<https://doi.org/10.1128/aem.72.5.3314-3320.2006>