

Título de la Tesis: “Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de fruta.”

Doctorado en Bioquímica

Autor: Brugnoli, Lorena Inés

Directores: Jorge E. Lozano - M. Amelia Cubitto

Resumen

Una de las causas más frecuentes de contaminación en la industria de los alimentos es la formación de biofilms ó biopelículas microbianas. La presencia de estas estructuras en las superficies de equipos y cañerías, comprometen la efectividad de los procesos de sanitización, causan contaminación del producto durante el proceso y afectan la operatividad de algunos equipos.

Los ensayos realizados durante el desarrollo de esta tesis doctoral tuvieron como objetivo general abordar el fenómeno de formación de biofilms de levaduras en equipos de producción de jugo concentrado de manzana con el propósito de lograr un mejor entendimiento del mismo y sugerir estrategias de control.

A partir de los aislamientos realizados en las distintas muestras de jugo obtenidas en una planta productora de jugo concentrado de manzana localizada en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (AVRNN), se concluyó que los hongos fueron los microorganismos predominantes en las mismas. Se aislaron e identificaron cuatro cepas de levaduras: *Kluyveromyces marxianus*, *Candida krusei*, *Zygosaccharomyces* sp. y *Rhodotorula rubra*, que coinciden con aquellas consideradas por la bibliografía (Pitt y Hocking, 1997) como agentes de deterioro cuando los alimentos no se producen de acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

El siguiente objetivo planteado en el transcurso de esta tesis fue caracterizar a las levaduras aisladas según sus propiedades fisicoquímicas de superficie, a fin de comprobar la hipótesis que éstas, conjuntamente con las características del medio de suspensión y las superficies abióticas, estarían relacionadas con el inicio de un biofilm. La correlación entre la adhesión y las propiedades de superficie estudiadas (carga de superficie celular, floculación, hidrofobicidad) se analizaron bajo la luz de los modelos teóricos propuestos derivados de la química de coloides y superficies: teoría DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek), teoría DLVO extendida (XDLVO) y aproximación termodinámica. En las

Título de la Tesis: “Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de fruta.”

Doctorado en Bioquímica

Autor: Brugnoli, Lorena Inés

Directores: Jorge E. Lozano - M. Amelia Cubitto

condiciones de ensayo, los coeficientes de floculación y potencial zeta exhibidos por todas las levaduras no mostraron relación con la cinética de adhesión de las mismas sobre las superficies de acero inoxidable ensayadas. Resultó evidente al observar la cinética de adhesión de las cuatro cepas de levaduras que las interacciones electrostáticas por sí solas no explican la adhesión de las mismas. Por otra parte, los resultados determinaron que el porcentaje de hidrofobicidad expresado por las superficies de las células a pH 3.0 correlaciona positivamente con la velocidad de adhesión de cada cepa al acero inoxidable en presencia de jugo clarificado de manzana de 12 °Brix.

Una confirmación de lo discutido anteriormente se observó en la práctica con la modificación química del acero inoxidable en ensayos con recubrimientos hidrofóbicos (TEOS al 20 %) e hidrofílicos (SiO_2). Se concluyó que, considerando las características hidrofóbicas del acero inoxidable, es razonable pensar que cuanto mayor sea la expresión de esta propiedad por parte de la superficie celular, mayor será la adhesión sobre este material.

En condiciones industriales es importante conocer cómo el comportamiento de los líquidos que circulan a través de un sistema influye sobre la adhesión celular. A partir de la hipótesis que las condiciones de flujo modifican la adhesión celular a sustratos abióticos, uno de los objetivos propuestos fue diseñar en nuestro laboratorio una celda de flujo que nos permitiera estudiar la adhesión y colonización de las levaduras en estudio en flujo laminar para simular las situaciones de flujo en parte de las tuberías de conducción utilizadas en la industria.

Los resultados de nuestros ensayos demuestran que las cuatro cepas de levaduras adhieren rápidamente en condiciones hidrodinámicas semi-estáticas (flujo estacionario) y de flujo laminar sobre superficies comúnmente usadas en plantas procesadoras de alimentos. La alta afinidad por el acero inoxidable demostrada por *C. krusei* y *K. marxianus* podría actuar, entre otros, como un factor de supervivencia y selección. Estas levaduras podrían estar colonizando las superficies de los tanques de clarificación y los accesorios de filtración, lo cual explicaría el alto recuento observado de las mismas en el jugo de manzana

Título de la Tesis: “Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de fruta.”

Doctorado en Bioquímica

Autor: Brugnoli, Lorena Inés

Directores: Jorge E. Lozano - M. Amelia Cubitto

clarificado (muestra M₃). En base a los resultados obtenidos se pudo afirmar que bajo condiciones hidrodinámicas de flujo laminar, la adhesión celular se ve modificada. Esto puede explicarse considerando que, durante la colonización y formación de biofilms, las células pueden experimentar modificaciones fenotípicas que favorecen el anclaje de las mismas a las superficies (Delissalde y col., 2004; Gilbert y col., 2003). Este fenómeno se evidencia en tiempos de contacto célula-sustrato relativamente largos, no así en las primeras horas de adhesión, donde predomina el efecto de las características fisicoquímicas de las células. Fue el caso de *Zygosaccharomyces* sp., donde las condiciones de flujo alteraron su morfología de desarrollo: de un patrón unicelular disperso en condiciones semiestáticas, evolucionó hacia una configuración pseudomicelial en condiciones de flujo laminar.

A fin de responder a la hipótesis planteada del efecto de los sistemas de sanitización sobre células iniciando un biofilm, se realizó la evaluación de la aplicación de dos desinfectantes habitualmente empleados en la industria sobre las cuatro cepas de levaduras en las distintas condiciones de crecimiento (planctónicas, sésiles y formando microcolonias) que podrían darse en una planta productora de jugo concentrado de manzana.

Lo anterior nos llevó a planteamos uno de los principales objetivos de esta tesis doctoral: desarrollar un ensayo simple, realista y reproducible para evaluar la efectividad de un desinfectante sobre células de levaduras autóctonas en activa colonización de superficies de acero inoxidable, imitando las condiciones a las que éstas se ven sometidas en la industria concentradora de jugo de manzana (matriz alimentaria, condiciones de flujo, temperatura y tiempos de contacto con las superficies de producción). Previamente, era necesario establecer el Efecto Microbicida (EM) para cada cepa de levadura a través de ensayos en suspensión frente a dos de los desinfectantes más comúnmente utilizados en la industria juguera: el hipoclorito de sodio y los compuestos de amonio cuaternario.

Los resultados obtenidos muestran que el comportamiento frente a los desinfectantes de las cepas de levaduras estudiadas difiere significativamente según se encuentren adheridas a superficies o en desarrollo planctónico. Más aún, en el caso de las

Título de la Tesis: “Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de fruta.”

Doctorado en Bioquímica

Autor: Brugnoli, Lorena Inés

Directores: Jorge E. Lozano - M. Amelia Cubitto

células iniciando un biofilm en condiciones de flujo laminar encontramos la mayor resistencia a la acción desinfectante del hipoclorito de sodio en las dos cepas ensayadas.

En desarrollo planctónico se obtuvo el efecto microbicida esperado con la menor concentración de uso (0.20 g Cl/L), mientras que sobre células adheridas en condiciones de flujo estacionario (poco o ningún esfuerzo de corte) fue necesario duplicar la dosis (0.50 g Cl/L). En el caso de *Zygosaccharomyces* sp., para obtener un EM > 3 en los ensayos de colonización en condiciones de flujo laminar, fue necesario combinar la acción de un detergente alcalino microbicida con la mayor concentración de hipoclorito de sodio ensayada. Estos resultados muestran claramente que la evaluación de la eficacia de un desinfectante sobre biofilms debe ser realizada utilizando un método donde la adhesión y colonización de las células se lleve a cabo en condiciones de flujo similares a las del entorno donde se aplicará el desinfectante, y que aún utilizando superficies nuevas y realizando las secuencias de limpieza y sanitización en condiciones óptimas, existe el riesgo de que el número de células viables remanentes sobre las superficies puedan generar un nuevo biofilm.

Título de la Tesis: “Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de fruta.”

Doctorado en Bioquímica

Autor: Brugnoli, Lorena Inés

Directores: Jorge E. Lozano - M. Amelia Cubitto

Abstract

One of the most common causes of biofouling in the food industry is the microbial biofilm formation. The presence of these structures on the surfaces of equipment and pipes, compromise the effectiveness of cleaning and disinfection program. In addition, corrosion of the process equipment and a change in heat transmission has been observed as a consequence of biofilm formation.

In this thesis, the overall phenomenon of biofilm development by yeast cells isolated from an apple juice processing plant was studied to achieve a better understanding of the same and to suggest control strategies.

Based on the isolation from different samples of juice obtained in a concentrate apple juice processing plant located in the Alto Valle del Río Negro y Neuquén (AVRNN), it was concluded that fungi were the predominant microorganisms. We isolated and identified four strains of yeast: *Kluyveromyces marxianus*, *Candida krusei*, *Zygosaccharomyces* sp. and *Rhodotorula rubra*, considered by the bibliography (Pitt and Hocking, 1997) as agents of deterioration when food is not produced in accordance with the Good Manufacturing Practices (GMP).

The next goal raised in the course of this thesis was to characterize the yeast isolated according to its physicochemical surface properties, in order to test the hypothesis that these, together with the environmental characteristics of suspension and abiotic surfaces, would be related to the initiation of a biofilm. The correlation between adherence and surface properties (cell surface charge, flocculation, hydrophobicity) was analyzed under the light of the theoretical models proposed, derived from the chemistry of colloids and surfaces: Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory, extended (XDLVO) theory and thermodynamic approach. In experimental conditions, the flocculation coefficients and zeta potential exhibited by all yeast showed no correlation with the kinetic adhesion of them on stainless steel surfaces tested. From these preliminary observations, it can be concluded

Título de la Tesis: "Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de fruta."

Doctorado en Bioquímica

Autor: Brugnoli, Lorena Inés

Directores: Jorge E. Lozano - M. Amelia Cubitto

that adhesion was not controlled by electrostatic interactions under the experiment conditions imposed. Moreover, the results found that the percentage of hydrophobicity expressed by the yeast surfaces at pH 3.0, correlates positively with the rate of adhesion (no. of cells/min) of each strain on stainless steel in the presence of 12° Brix clarified apple juice

The confirmation of the above was observed experimentally with the chemical modification of stainless steel in assays with hydrophobic (20% TEOS) and hydrophilic (SiO₂) coatings. It was concluded that, considering the hydrophobic characteristics of stainless steel, it is reasonable to think that the greater the expression of this property by the cell surface, the greater the attachment on this material.

In industrial conditions it is important to know how the behavior of circulating fluid through a system influences on cell adhesion. Based on the assumption that the flow conditions modify the cell adhesion to abiotic substrates, one of the objectives was to design a flow chamber, enabling us to study the attachment and colonization of stainless steel surfaces by yeast strains under controlled hydrodynamic conditions to simulate the situation in the industry.

The results of the tests showed that the four yeast strains attach rapidly in semi static and laminar flow conditions on surfaces commonly used in food processing plants. The high affinity for stainless steel shown by *C. krusei* and *K. marxianus* could act, among others, as a survival and selection factor. These yeasts could colonize the clarification tanks surfaces and filtration accessories, which would explain the high count observed in clarified apple juice (sample M₃). Based on the results obtained we could say that under laminar flow conditions, the cell adhesion is modified. This can be explained considering that during colonization and biofilm formation, the cells can express phenotypic changes that contribute to anchoring them to surfaces (Delissalde et al., 2004; Gilbert et al., 2003). This phenomenon is evident in relatively long cell-substrate contact times, but not during the first hours of adhesion, where the effect of cell surface physicochemical characteristics dominates. Such was the case of *Zygosaccharomyces* sp. where flow conditions altered its

Título de la Tesis: “Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de fruta.”

Doctorado en Bioquímica

Autor: Brugnoli, Lorena Inés

Directores: Jorge E. Lozano - M. Amelia Cubitto

development morphology: from a unicellular dispersed pattern in semi static conditions it evolved into a pseudomycelial configuration in laminar flow conditions.

The latest hypothesis developed in this thesis referred to the effect of sanitizing systems on biofilm-associated cells, evaluating two disinfectants commonly used in industry (sodium hypochlorite and a commercial quaternary ammonium compound) on the four yeast strains in different growing conditions (planktonic, sessile and forming microcolonies) that could occur in a concentrate apple juice processing plant

This led us to consider one of the main objectives of this thesis: to develop a simple, realistic and reproducible test to assess the effectiveness of a disinfectant on endogenous yeast cells in active colonization of stainless steel surfaces, simulating the conditions they are subjected to in the concentrated apple juice industry (food matrix, flow conditions, temperature and contact time to processing surfaces). Previously, it was necessary to establish the Microbicidal Effect (ME) for each yeast strain through suspension tests against the disinfectants.

The results presented here show that biofilm cells are much more resistant to sanitizers compared to planktonic ones. Moreover, in the case of biofilm cells attached in laminar flow conditions, we find the greatest resistance to the action of sodium hypochlorite in the two strains tested.

In the case of sodium hypochlorite, in planktonic cells, the expected Microbicidal Effect was obtained using the lowest concentration (0.20 g Cl / L), while on cells attached in semi static conditions (little or no shear force) it was necessary to duplicate the dose at least (0.50 g Cl / L). In the case of *Zygosaccharomyces* sp., to obtain a ME > 3 in the tests on cells attached in laminar flow conditions, it was necessary to combine the action of an alkaline detergent with the largest concentration of sodium hypochlorite tested (0.50 g Cl / L).

These results clearly show that the evaluation of the effectiveness of disinfectants on biofilms should be conducted using a method where attachment and colonization of the cells is carried out under flow conditions similar to the environment where the disinfectant will be

Título de la Tesis: “Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de fruta.”

Doctorado en Bioquímica

Autor: Brugnoli, Lorena Inés

Directores: Jorge E. Lozano - M. Amelia Cubitto

applied. The results clearly show that even using new surfaces and conducting cleaning and sanitizing sequences in optimal conditions, there is a risk that viable cells remaining on the surfaces can generate a new biofilm.