

Biofilms bacterianos: una amenaza para la seguridad en la industria cárnica.

Evaluación de la capacidad formadora de biofilm de *Lactobacillus bacteriocinogénicos* sobre superficies industriales. Parte 1

Patricia Castellano*, Mariana Pérez Ibarreche y Graciela Vignolo
Centro de Referencia para Lactobacilos, CERELA, CONICET. Tucumán, Argentina

*patricia@cerela.org.ar



Resumen

Se investigó la capacidad formadora de biofilms en cepas de bacterias lácticas (BL) con actividad anti-*Listeria* en medios de cultivos y sobre superficies industriales a diferentes temperaturas. *Lactobacillus curvatus* CRL705, CRL1532 y *Lactobacillus sakei* CRL1862, aislados de productos cárneos fermentados argentinos, fueron inoculados sobre chips de acero inoxidable (AI) y Teflón™(T) en medios MRS, MRS sin Tween (-tMRS) y sin Tween/glucosa/MnSO₄ (-tgmMRS), incubados a 10°C y 30°C durante diferentes tiempos y analizados mediante epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido (MEB). Las BL evaluadas revelaron una superficie relativamente hidrofílica y de carácter ácido, exhibiendo *L. sakei* CRL1862 la mayor capacidad autoagregante. La adhesión a las superficies abióticas evaluadas resultó máxima para *L. sakei* CRL1862 sobre AI a los seis días (10°C) y a los tres días (30°C). La arquitectura de los biofilms formados por *L. sakei* CRL1862 (caracterizada microscópicamente por epifluorescencia y MEB) evidenció la formación de una homogénea cubierta biofilmogénica sobre la superficie de AI, mientras que grupos celulares irregulares se observa-

ron sobre la superficie de T. Se detectó una adaptación a la topografía y características hidrofílicas/hidrofóbicas del AI y T de la matriz polimérica extracelular producida por los lactobacilos evaluados. La capacidad biofilmogénica de *L. sakei* CRL1862 sobre superficies frecuentemente usadas en la industria frigorífica pone en evidencia su potencial como estrategia de control de biofilms de *Listeria monocytogenes*.

Palabras claves: Biofilms, adhesión, *Lactobacillus*, bacteriocinas, actividad anti-*Listeria*; superficies industriales inertes.

Introducción

En el contexto de globalización mundial, la producción de alimentos está más que nunca ligada al control de su procesamiento y de los microorganismos contaminantes y/o patógenos presentes. Las estadísticas muestran sostenidos incrementos de toxiinfecciones alimentarias (TA) registrándose un elevado número de muertes (CDC 2013; EFSA 2013), siendo los productos de origen animal los de mayor riesgo. Entre los "microorganismos emergentes" causantes de TA, *Listeria monocytogenes* continúa planteando problemas de seguridad alimentaria debido a su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración, pH entre 4.6 y 9.0 y en presencia de elevado contenido de sal (Carpentier y Cerf, 2011). Este patógeno es frecuentemente aislado a partir de alimentos, en particular de productos listos para consumir así como de los ambientes de procesamiento. En la industria alimentaria, y en particular la industria de la carne, es conocido que estas bacterias crecen sobre las superficies de procesamiento (tuberías, mesadas, cuchillos, etc.) congregándose en ciertas áreas en forma de biofilms (Di Bonaventura y col., 2008; Sofos y Geornaras, 2010). Este tipo de crecimiento es el responsable de la elevada resistencia de *L. monocytogenes* a los agentes antibacterianos y desinfectantes, causando serios problemas de higiene y grandes pérdidas económicas (Carpentier y Cerf, 2011; Sofos y Geornaras, 2010).

El reconocido rol antimicrobiano de las bacterias lácticas (BL) constituye una alternativa para el desarrollo de estrategias de control. Las BL son capaces de producir sustancias antimicrobianas que inhiben el desarrollo de microorganismos sensibles. Estas sustancias comprenden los productos del metabolismo del oxígeno, de carbohidratos y otras de naturaleza proteica, llamadas bacteriocinas. Estas últimas son péptidos de síntesis ribosomal que en su forma activa pueden inhibir a microorganismos relacionados. La producción de bacteriocinas fue detectada en todos los géneros de BL, constituyendo un fenotipo extensamente presente en este grupo bacteriano (Nissen-Meyer y col., 2009). En los últimos 30 años, numerosas bacteriocinas han sido caracterizadas y usadas como biopreservantes naturales en diferentes alimentos (Chen y Hoover, 2003; Gálvez y col., 2010; Vignolo y col., 2012). Estos péptidos antimicrobianos (PM < 10 kDa) demostraron su eficiencia en el biocontrol de patógenos (*L. monocytogenes*) y contaminantes (*Brochothrix thermosphacta*) en cultivos plancónicos (Castellano y col., 2004, 2008, 2010, 2012; Castellano y Vignolo, 2006), mientras que su acción inhibitoria en biofilms no fue aún muy estudiada. En consecuencia, el objeto de este estudio fue la selección de cepas de BL bacteriocinogénicas capaces de formar biofilm en las condiciones existentes durante el procesamiento de carne.

Materiales y métodos

Microorganismos, medios de cultivos y actividad anti-*Listeria*

Se emplearon 20 cepas de BL (*Lactobacillus* y *Pediococcus*) previamente aisladas de carne y embutidos fermentados, pertenecientes a la colección de cultivos de CERELA. Las cepas fueron cultivadas en medio MRS e incubadas a 30°C durante 18 h. También fueron usados otros medios en los cuales se omitieron Tween 80 (-tMRS), Tween 80/glucosa/MnSO4 (-tgmMRS). Para la actividad antagonica se usó *Listeria innocua* 7 la que se desarrolló a 30°C en medio BHI (Brain Heart Infussion). Para el BioTimerassay se usó el medio Rojo

Fenol (BT-RF) determinándose las UFC/ml en MRS. La actividad anti-*Listeria* de las BL se determinó mediante el spot-on-lawn assay usando *L. innocua* 7 como organismo sensible (Castellano y col., 2010).

Formacion de biofilm in vitro

La capacidad formadora de biofilm de las BL bacteriocinogénicas fue evaluado mediante la técnica colorimétrica usando cristal violeta en microplacas de poliestireno (Lebeer y col., 2007) en MRS y -tMRS a 30°C durante 24, 48 y 72 h y 6, 10 y 15 días a 10°C. Para determinar la capacidad de adhesión de las BL se usó el criterio propuesto por Stepanovic y col. (2000), basado en la línea de corte entre negativos y positivos, definida como tres veces el desvío estándar por encima de la media de DO del control negativo.

Características superficiales de las BL

Se evaluó la adhesión microbiana a solventes (del inglés MATS) según Bellon-Fontaine y col., (1996). Se usaron tres solventes diferentes, hexadecano para determinar hidrofobicidad/hidrofilicidad, cloroformo y etil-acetato para determinar el carácter ácido-básico superficial. Se determinó el porcentaje de adhesión bacteriana a los solventes $(1 - A1/A0) \times 100$. También se determinó la capacidad autoagregante de las cepas de BL (Sorroche y col., 2010).

Formación de biofilm sobre chips de acero inoxidable (AI) y Teflon™ (T)

Los chips de AI (tipo AISI 304) y T (1 cm² y 1 mm de espesor) fueron tratados con acetona (30 min), NaOH 1N (1 h) y enjuagados con agua destilada antes de su uso. El desarrollo del biofilm se realizó en cajas de Petri con el medio de cultivo estéril y los chips inoculados con las cepas de BL productoras de bacteriocina y biofilm fueron incubados a 10 y 30°C durante seis días. El medio fue luego removido y los chips enjuagados con buffer PBS (pH 7.2) para realizar el recuento celular mediante el BT assay previamente descrito por Pantanella y col., (2008). Este método indirecto permite determinar el número de bacterias en el biofilm basado

UNA EMPRESA JOVEN PROVEEDORA DE LAS PRINCIPALES INDUSTRIAS DEL PAIS

◀ Cintas transportadoras especiales

▶ Pegadoras de cintas adhesivas. De acero inoxidable o chapa común

Envolvedora de Pallets. La gama más completa del país (manuales, automáticas, de brazo rotante)

INDUSTRIAS

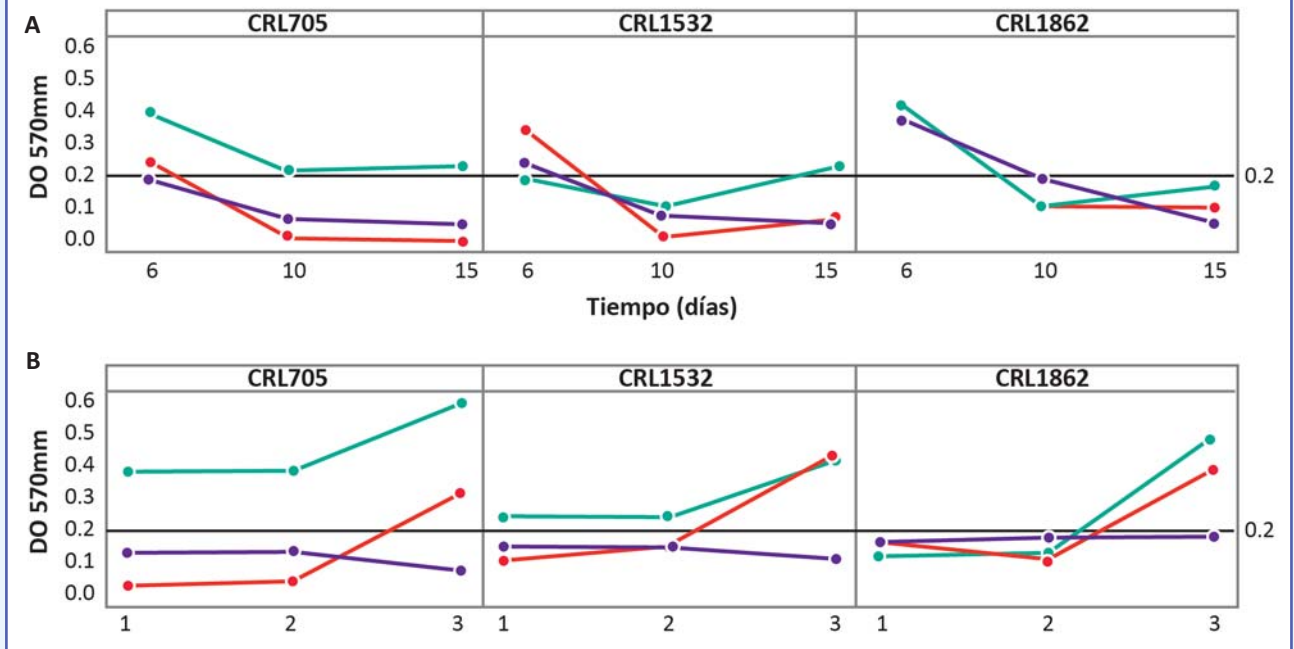
 FABRICA DE MAQUINAS PARA EMBALAJAJES

Excelente servicio post venta

Industria Argentina

Calle San Juan y Ruta Nac. 34 – Parcela 13 - Pque. Ind. (S2322BMD) Sunchales – Santa Fe - Tel./Fax: (54 3493) 421741/423441 - ventas@danielgenta.com - www.danielgenta.com

Figura 1. Gráfico de dispersión. Crecimiento en biofilm de cepas de lactobacilos a 10 °C (A) y 30 °C (B) durante 15 y 3 días, respectivamente usando diferentes medios de cultivo, MRS (---); -tMRS (---) y -gtmMRS (---). Línea de corte (---).



en el tiempo de viraje del rojo fenol provocado por el metabolismo bacteriano (producción de ácido) mediante una curva de calibrado (equivalentes plantónicos log UFC/cm²). Para caracterizar la arquitectura del biofilm se usó microscopía de epifluorescencia, tiñendo con naranja de acridina, y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) mediante fijado de las células (Karnovsky, 1965), lavado de los chips con O4Os, deshidratación (etanol y acetona) y deposición de oro antes de la captura de las imágenes. La presencia de células vivas y sustancias poliméricas extracelulares en los biofilms se reveló usando los colorantes fluorescentes DAPI y concanavalina A-FITC (ConA-FITC), respectivamente.

Resultados y discusión

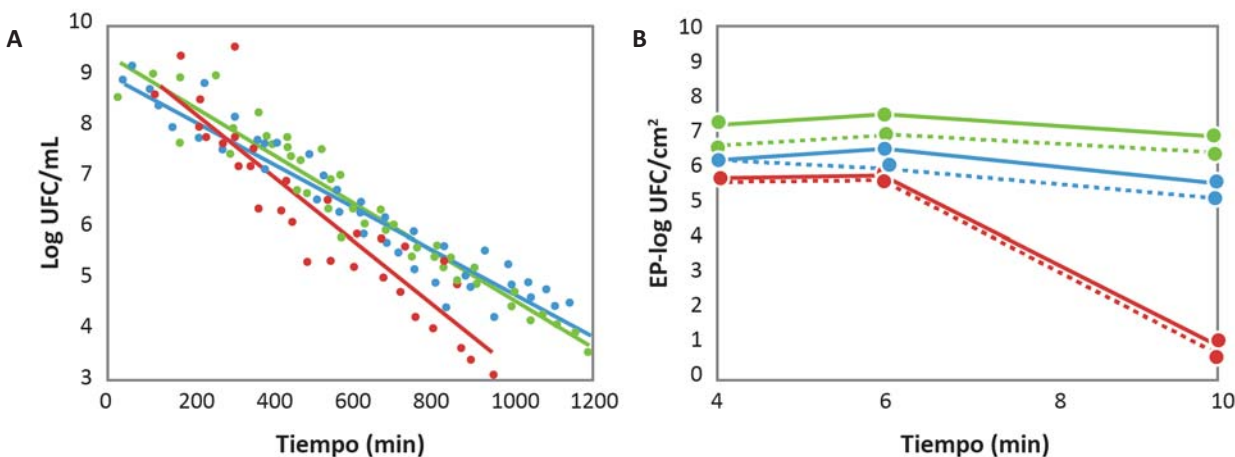
La evaluación de la actividad anti-*Listeria* de 20 cepas de BL (19 *Lactobacillus* y una cepa de *Pediococcus*) mostró que diez cepas, incluyendo *L. curvatus* (CRL705, CRL1863, CRL1533, CRL1534, CRL1536, CRL1538 y CRL1539) y *L. sakei* (CRL1613 y CRL1862), exhibieron elevada actividad inhibitoria frente a *L. innocua* 7 (datos no mostrados). Estas dos especies de *Lactobacillus* -muy cercanas filogenéticamente- han sido aisladas como las más representativas de nichos ecológicos cárneos, como carne fresca envasada bajo vacío y embutidos fermentados (Vignolo y col., 2010). Asimismo, *L. sakei* y *L. curvatus* fueron descritas como productoras de bacteriocinas como herramienta competitiva en estos nichos ecológicos y en particular como productoras de péptidos anti-*Listeria* (Urso y col., 2006; Vignolo y col., 2012) en carne refrigerada envasada bajo vacío (Jones y col., 2010). De hecho, el análisis del genoma de *L. curvatus*

CRL705 mostró la presencia de cinco genes que codifican para la producción de diferentes bacteriocinas, enfatizando su potencial como cultivo bioconservador (Hebert y col., 2012)

Por otra parte, las BL productoras de bacteriocinas fueron evaluadas en su capacidad biofilmogénica en diferentes medios de cultivo y condiciones de tiempo-temperatura. La adhesión de *Lactobacillus* (CRL1532, CRL1862 y CRL705) a microplacas de poliestireno (Figura 1) mostró dos patrones diferentes. La adhesión celular resultó máxima a los seis días de incubación a 10°C para todas las cepas seleccionadas (Figura 1A), mientras que a 30°C se observaron mayores niveles de biofilm luego de tres días de incubación (Fig. 1B). Los cultivos en MRS y -tMRS presentaron mayor formación de biofilm en las tres cepas de *Lactobacillus*, por el contrario, en el medio -gtmMRS la capacidad de adhesión fue menor, sugiriendo que medios más pobres no promueven la adhesión de estos lactobacilos en placas de poliestireno.

A diferencia de los resultados obtenidos, la formación de biofilm de *L. rhamnosus* GG y lactobacilos vaginales se vio disminuida en presencia de Teewn 80 (Lebeer y col., 2007; Leccese Terraf y col., 2012). *L. sakei* CRL1862, *L. curvatus* CRL705 y CRL1532 no formaron biopelículas en ausencia de glucosa (fuente principal de carbono del medio MRS) y de Mn⁺⁺ (estimulante del crecimiento), en coincidencia con otros estudios en los cuales *L. acidophilus* y diferentes cepas de *L. rhamnosus* y *L. casei* fueron incapaces de formar biofilms en medios carentes de fuentes de carbono (Schar-Zammaratti y col., 2005; Lebeer y col., 2007). Sin embargo, la capacidad de producción de biofilms de *Salmonella* spp. y *L.*

Figura 2. BioTimer Assay. (A) Líneas de correlación correspondientes al tiempo de cambio de color del medio BT-PR en función del número de células planctónicas de *L. curvatus* CRL705 (—), *L. curvatus* CRL1532 (—) y *L. sakei* CRL1862 (—); (B) Adhesión de las cepas de *Lactobacillus* al AI (líneas continuas) y T (líneas punteadas) a 10 °C durante 10 días. EP-log UFC/cm²: equivalente planctónico-log UFC por chip.



monocytogenes no se vio alterada en presencia de medios pobres y ricos en nutrientes (Stepanovic y col., 2004). En este estudio, *L. sakei* CRL1862, *L. curvatus* CRL705 y CRL1532 fueron capaces de crecer formando biofilms a 10°C y su máximo nivel fue alcanzado a los seis días, evidenciando la dependencia de la cepa, composición de medio y factores fisicoquímicos para la formación de biofilm.

Cuando se estudiaron las propiedades superficiales de las tres cepas anti-*Listeria* previamente seleccionadas, se observó baja adhesión a los hidrocarburos ensayados (Tabla 1). No obstante, se observó una leve afinidad al solvente no polar hexadecano ($4.8 \pm 2.6\%$, para CRL705 y $3.0 \pm 0.2\%$, para CRL1532), mientras que *L. sakei* CRL1862 mostró ausencia total de afinidad. Por el contrario, CRL1862 exhibió el máximo valor de afinidad a etil-acetato (solvente básico-dador de electrones), seguido por *L. curvatus* CRL705 y CRL1532, mientras que las tres cepas de BL mostraron no adherirse a cloroformo (solvente ácido, aceptor de electrones). De estos resultados puede inferirse una superficie mayoritariamente hidrofílica para las cepas de BL en estudio. La baja afinidad por el hexadecano observada concuerda con lo descrito para cepas de origen lácteo (*L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. paracasei*) que mostraron valores comprendidos entre 2.7 y 26.5% (Pelletier y col., 1997). Los valores obtenidos mediante MATS indicarían una baja hidrofobicidad de la superficie celular de *L. sakei* CRL1862 y *L. curvatus* CRL705 comparada con lo reportado para lactobacilos orales (Samot y col., 2011). El relativo carácter hidrofílico de las cepas seleccionadas coincide con otros estudios de BL (Ly y col., 2006). La adhesión bacteriana a cloroformo y etil-acetato permitió establecer las características ácido-base de Lewis de

Figura 3. Micrografías de epifluorescencia del desarrollo de *L. sakei* CRL1862 sobre chips de AI (A) y T (B) incubados a 10°C durante 6 días. Biofilms teñidos con naranja de acridina. Aumento 100x.

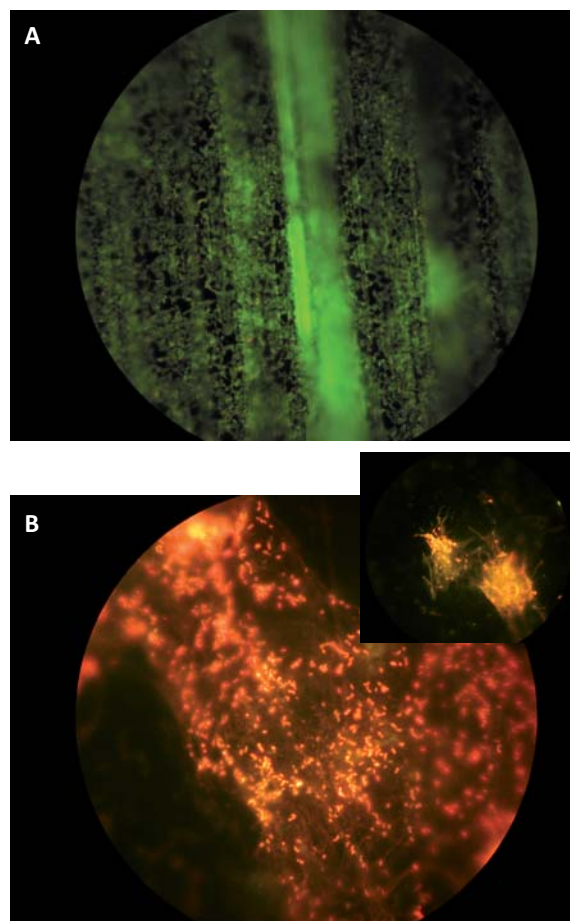
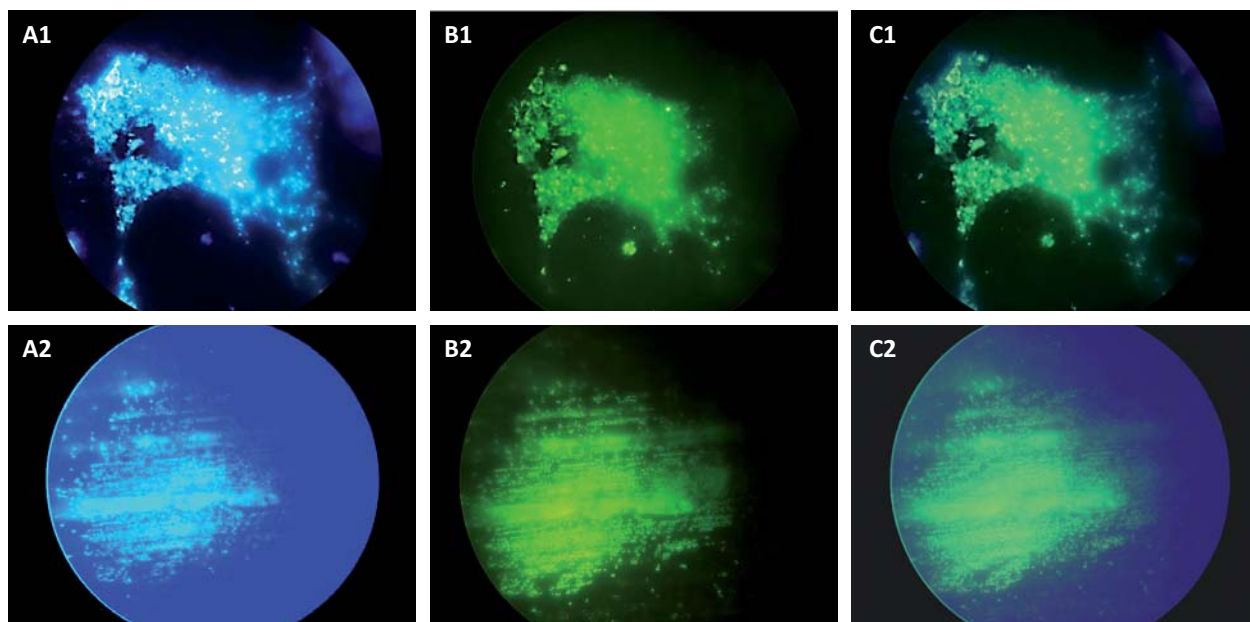


Figura 4. Microscopía de fluorescencia de biopelículas de *L. sakei* CRL1862 formadas sobre T (1) y AI (2). A: Distribución del biofilm sobre la superficie (tinción con DAPI), B: presencia de sustancias poliméricas extracelulares (tinción con ConA-FITC) y C: imagen A superpuesta con imagen B.



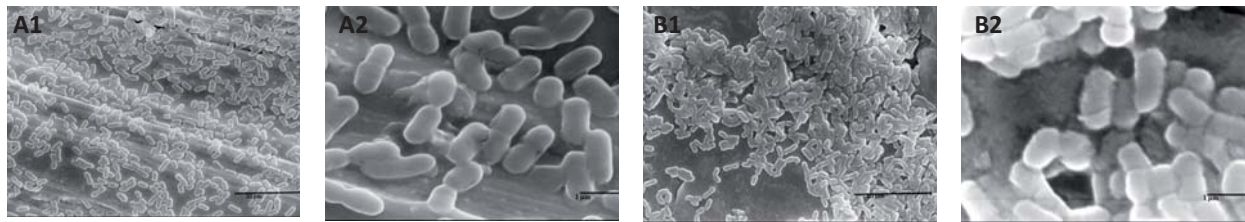
la superficie celular; la mayor adhesión a etil-acetato que a cloroformo exhibida por *L. sakei* CRL1862 y *L. curvatus* CRL705 indicaría un leve carácter ácido de la superficie (aceptor de electrones) en contraste con lo informado para *Lactococcus lactis* de diversos orígenes (Giaouris y col., 2009; Pelletier y col., 1997). La producción de ácido por las cepas de *Lactobacillus* conduce a la presencia de grupos aceptores de electrones sobre la pared celular, siendo éstos responsables de la afinidad con el solvente dador de electrones (etil-acetato). La presencia de compuestos ácidos ligados a la pared celular explicaría el carácter ácido de CRL1862 y CRL705. Con respecto a la autoagregación, en base a los porcentajes determinados, *L. sakei* CRL1862 puede definirse como una cepa fuertemente autoagregativa, mientras que sólo podría sugerirse una intermedia capacidad para CRL705 y CRL1532. Teniendo en cuenta las propiedades superficiales de las BL bacteriocinogénicas evaluadas, la habilidad para autoagregar junto al bajo carácter hidrofílico podrían ser usados como criterio preliminar para evaluar la capacidad biofilmogénica sobre superficies de interés industrial.

Además se evaluó la capacidad de estos lactobacilos para formar biofilm sobre chips de AI y T mediante el BioTimer assay. Los datos obtenidos mostraron una correlación lineal entre el cambio de color del indicador y los log de las unidades formadoras de colonias (UFC) para cada cepa (cultivo plantónico) evaluada (Fig. 2A). Los resultados mostraron similares recuentos para la colonización de las tres cepas sobre AI y T incubados en MRS a 10°C durante seis días (Fig. 2B). *L. sakei* CRL1862 mostró los mayores valores celulares sobre ambas superficies abióticas. Un menor número de células adheridas fue obtenido para CRL1532, mientras que una fuerte disminución en los recuentos luego de los seis días a 10°C se detectó para la cepa CRL705. El AI, a pesar del alto costo y susceptibilidad a la corrosión, es aún el material más frecuentemente empleado en equipos y superficies de procesamiento en la industria de alimentos. No obstante, los polímeros plásticos han ganado mucho terreno, entre ellos el Teflon™ es cada vez más usado como recubrimiento de superficies por sus propiedades únicas (Pompermayer y Gaylarde, 2000). En este estudio, independientemente de la cepa evaluada, los

Tabla 1 - Porcentaje de autoagregación e hidrofobicidad de cepas de *Lactobacillus*

	Hidrofobicidad			Autoagregación	
	Hexadecano	Cloroformo	Acetato de etilo	MRS	-tMRS
<i>L. curvatus</i> CRL705	4,8 ± 2,6	-8,8 ± 3,9	7,5 ± 5,9	35,2 ± 1,1	63,0 ± 3,2
<i>L. curvatus</i> CRL1532	3,0 ± 0,2	-10,2 ± 4,4	6,1 ± 0,3	14,3 ± 2,1	77,8 ± 0,3
<i>L. sakei</i> CRL1862	0,0 ± 0,0	-7,0 ± 5,8	10,5 ± 3,6	49,3 ± 1,4	84,4 ± 2,0

Figura 5. Imágenes de MEB de la biopelícula de *L. sakei* CRL1862 formada sobre Al (A) y T (B) usando el medio MRS incubado a 10°C durante 6 días. Observación a baja (A1, B1) y alta (A2, B2) resolución.



máximos recuentos celulares fueron registrados sobre los chips de Al durante la incubación en MRS a 10°C, en coincidencia con el relativo carácter hidrofílico de las superficies de los lactobacilos evaluados. A pesar que la naturaleza hidrofílica del Al es bien reconocida, también fue descrita como hidrofóbica (Brugnoni y col., 2007), dependiendo de la composición química y el acabado de su superficie, así como la metodología usada para medir la hidrofobicidad. En coincidencia con los resultados de este estudio, la velocidad de adhesión de *Streptococcus* de origen lácteo fue potenciada en presencia de un sustrato hidrofílico como el Al (Flint y col., 2000). Por otra parte, si bien la colonización sobre ambas superficies abióticas resultó evidente a 10°C, la población adherente de *L. sakei* CRL1862 sobre chips de Teflon™ fue menor que en Al. La combinación del carácter hidrofílico de la pared celular de los lactobacilos y la superficie hidrofóbica del Teflon™ condujo a una significativa menor colonización, como fue reportado para *L. monocytogenes* sobre sustratos hidrofóbicos (Chavant y col., 2002).

En base a las mejores características biofilmogénicas exhibidas por *L. sakei* CRL1862, se analizó la arquitectura de los biofilms formados sobre las dos superficies abióticas mediante técnicas microscópicas. Las fotomicrografías correspondientes al máximo número de células del biofilm tomadas mediante microscopía de epifluorescencia se muestran en la Figura 3. Se observó una homogénea cobertura celular en los chips de Al (Figura 3A), mientras que grupos celulares aparecen sobre la superficie de T (Figura 3B). Estos resultados concuerdan con la característica superficial hidrofílica de *L. sakei* CRL1862 que provocaría una mejor colonización sobre Al que sobre T. En particular, las células de CRL1862 se presentaron alineadas a lo largo de las estriaciones de las visibles imperfecciones resultantes del pulido del Al, mientras que sobre la superficie polimérica del T se observan empaquetamientos de células muy próximos y embebidos en una nube de material claramente visible y unido por ramificaciones filamentosas que sugieren la presencia de material celular (ADN/ARN). Mediante el uso de una lectina con marcación fluorescente (concanavalina A), pudo visualizarse la presencia de carbohidratos en la matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidos por *L. sakei* CRL1862 (Figura 4). La presencia de biofilm está

estrechamente relacionada con la presencia de esta matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares, que resulta esencial para la estabilidad mecánica y adhesión mediante una red tridimensional cohesiva que interconecta e inmoviliza transitoriamente a las células en el biofilm (Flemming y Wingender, 2010). Mediante microscopía de barrido también se evidenciaron patrones de adhesión similares a los observados por microscopía epifluorescente (Figura 5).

Notablemente, la matriz de sustancias extracelulares del biofilm formado por *L. sakei* CRL1862 sobre ambas superficies mostró gran adaptación a la topografía del material, en Al el biofilm formado sobre las estrías del pulido aparece suavizando la microestructura del material, en contraste con la amorfa masa de sustancias extracelulares que rodea a los clusters de bacterias sobre la superficie de Teflon™.

Conclusión

El screening de BL anti-*Listeria* permitió seleccionar la cepa *L. sakei* CRL1862 como la mejor formadora de biofilm sobre superficies de acero inoxidable y Teflon™ a 10°C. La formación de biofilm por cepas de BL podría facilitar y promover la colonización de materiales inertes regularmente usados en la industria de la carne, inhibiendo el asentamiento de patógenos. Las características de esta cepa permitirían su aplicación en la inhibición de *L. monocytogenes* mediante diferentes estrategias, actualmente en evaluación.

Referencias

- Bellon-Fontaine, M-N, Rault, J, y van Oss, C.J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47-53.
- Brugnoni, LI, Lozano, JE, y Cubitto, MA. (2007). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International* 40, 332-340.
- Carpentier, B, y Cerf, O. (2011). Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1-8.
- Castellano, P, Holzappel, WH, y Vignolo, G. (2004). The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705. *Food Microbiology* 21, 291-298.

- Castellano, P, y Vignolo, G. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 194-199.
- Castellano, P, Belfiore, C, Fadda, S, y Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science* 79, 483-499.
- Castellano, P, Gonzalez, C, y Vignolo, G. (2010). Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum packaged raw beef. Effect on microstructural characteristics. *Meat Science* 85, 394-401.
- Castellano, P, Aristoy, MC, Sentandreu, MA, Vignolo, G, y Toldrá, F. (2012). *Lactobacillus sakei* CRL1862 improves safety and protein hydrolysis in meat systems. *Journal of Applied Microbiology* 113, 1407-1416.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks - United States, 2009-2011. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. report* 62, 448-452.
- Chavant, P, Martinie, B, Meylheuc, T, Bellon-Fontaine, MN, y Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* L028: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 728-737.
- Chen, H, y Hoover, DG. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2, 82-100.
- Di Bonaventura, G, Piccolomini, R, Paludi, D, D'Orio, V, Vergara, A, Conter, M, y Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1552-1561.
- EFSA, European Food Safety Authority (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011. Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal* 11, 3241-3316.
- Flemming, H-K, y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623-633.
- Flint, SH, Brooks, JD, y Bremer, PJ. (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering* 43, 235-242.
- Gálvez, A, Abriouel, H, Benomar, N, y Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 142-148.
- Giaouris, E, Chapot-Chartier, M-P, y Briandet, R. (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International Journal of Food Microbiology* 131, 2-9.
- Hebert, EM, Saavedra, L, Taranto, MP, Mozzi, F, Magni, C, Nader, ME, y Raya, RR. (2012). Genome sequence of the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CRL705. *Journal of Bacteriology* 194, 538-539.
- Jones, RJ, Wiklund, E, Zagorec, M, y Tagg, JR. (2010). Evaluation of stored lamb biopreserved using a three-strain cocktail of *Lactobacillus sakei*. *Meat Science*, 86(4), 955-959.
- Karnovsky, MJ. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 27, 137-138.
- Lebeer, S, Verhoeven, TL, Perea Velez, M, Vanderleyden, J, y De Keersmaecker, SC. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6768-6775.
- Leccese Terraf, MC, Juarez Tomas, MS, Nader-Macias, ME, y Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6), 1517-1529.
- Ly, MH, Vo, NH, Leb, TM, Belin, J-M, y Waché, Y. (2006). Diversity of the surface properties of Lactococci and consequences on adhesion to food components. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 52, 149-153.
- Nissen-Meyer, J, Rogne, P, Oppegård, C, Haugen, HS, y Kristiansen, P. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10, 19-37.
- Pantarella, F, Valenti, P, Frioni, A, Natalizi, T, Coltella, L, y Berlutti, F. (2008). BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *Journal of Microbiological Methods* 75, 478-484.
- Pelletier, C, Bouley, C, Cayuela, C, Bouttier, S, Bourlioux, P, y Bellon-Fontaine, M-N. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1725-173.
- Pompermayer, DMC, y Gaylarde, CC. (2000). The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology* 17, 361-365.
- Samot, J, Lebreton, J, y Badet, C. (2011). Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Anaerobe* 17, 69-72.
- Schar-Zammaretti, P, Dillmann, ML, D'Amico, N, Affolter, M, y Ubbink, J. (2005). Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8165-8173.
- Sofos, JN, y Geornaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in non intact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products. *Meat Science* 86, 2-14.
- Sorroche, F, Rinaudi, LV, Zorreguieta, A, y Giordano, W. (2010). EPS II-dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells. *Current Microbiology* 61, 465-470.
- Stepanovič, S, Vuković, D, Dakić, I, Savić, B, y Svabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.
- Stepanovič, S, Čirković, I, Ranin, L, y Svabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology* 38, 428-432.
- Urso, R, Rantsiou, K, Cantoni, C, Comi, G, y Cocolin, L. (2006). Sequencing and expression analysis of the sakacin P bacteriocin produced by a *Lactobacillus sakei* strain isolated from naturally fermented sausages. *Applied Microbiological Biotechnology* 71, 480-485.
- Vignolo, G, Fontana, C, y Cocconcelli, PS. (2010). New approaches for the study of Lactic Acid Bacteria biodiversity: A focus on meat ecosystems. En F. Mozzi, R. Raya, y G. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (pp. 251-271). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Vignolo, G, Saavedra, L, Sesma, F, y Raya, R. (2012). Food bio-protection: lactic acid bacteria as natural preservatives. In *Progress in Food Preservation* ed. Bath, R., Alias, A.K. and Paliyath, G. pp. 453-483. Ames, IA: Wiley-Blackwell.