

# Crecimiento bacteriano y formación de biofilms de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* sobre vidrio, poliestireno y acero inoxidable AISI 304L.

## Bacterial growth and biofilm formation of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* on glass, polystyrene, and AISI 304L stainless steel.

Doctoranda:

**Melisa Romina BAUMANN**

<https://orcid.org/0009-0009-9153-940X>

Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María, Córdoba, Argentina  
[melisabaumann4@gmail.com](mailto:melisabaumann4@gmail.com)

Directora:

**Andrea GOMEZ SANCHEZ**

Codirectora:

**Fernanda Gabriela BIOLE**

### Resumen

La formación de biofilms sobre superficies de acero inoxidable representa un desafío para el control microbiológico en establecimientos lecheros y en la industria alimentaria. Este trabajo tiene como objetivo evaluar la formación de biofilms de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, bajo distintas condiciones, sobre vidrio, poliestireno y acero inoxidable AISI 304L. Las curvas de crecimiento permitieron determinar velocidades específicas de crecimiento de  $1,2 \text{ h}^{-1}$  y  $1,4 \text{ h}^{-1}$ , y tiempos generacionales de 34 y 30 min para *E. coli* y *E. faecalis*, respectivamente. Posteriormente, se evaluó cualitativa y cuantitativamente la capacidad de ambas especies para formar biofilms en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Ambas bacterias desarrollaron biofilms sobre las tres superficies evaluadas y, en todos los casos, la suplementación con glucosa favoreció su formación. *E. coli* mostró una mayor dependencia de la concentración de glucosa, mientras que *E. faecalis* presentó una formación de biofilm más estable una vez suplementado el medio. A partir de estos resultados se establecieron las condiciones experimentales para la formación reproducible de biofilms sobre vidrio, poliestireno y acero inoxidable AISI 304L, definiendo como condiciones óptimas la incubación a  $28^\circ\text{C}$  en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con 0,75 % de glucosa durante 48 h. Este modelo experimental constituye la base para la siguiente etapa, orientada a evaluar el efecto del agua activada por plasma (Plasma Activated Water, PAW) como estrategia innovadora para el control de biofilms bacterianos sobre superficies de acero inoxidable de interés para la industria alimentaria.

**Palabras clave:** Biofilm; acero inoxidable; industria alimentaria.

### Abstract

Biofilm formation on stainless steel surfaces represents a challenge for microbiological control in dairy facilities and the food industry. This study aims to evaluate the formation of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* biofilms under different conditions on glass, polystyrene, and AISI 304L stainless steel. Growth curves were used to determine specific

growth rates of 1.2 h<sup>-1</sup> and 1.4 h<sup>-1</sup>, and generation times of 34 and 30 min for *E. coli* and *E. faecalis*, respectively. Subsequently, the ability of both species to form biofilms in the presence of different glucose concentrations was evaluated both qualitatively and quantitatively. Both bacteria developed biofilms on the three tested surfaces, and in all cases, glucose supplementation promoted biofilm formation. *E. coli* showed a greater dependence on glucose concentration, whereas *E. faecalis* exhibited more stable biofilm formation once the medium was supplemented. Based on these results, the experimental conditions for the reproducible formation of biofilms on glass, polystyrene, and AISI 304L stainless steel were established, defining incubation at 28 °C in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 0.75% glucose for 48 h as the optimal conditions. This experimental model provides the foundation for the next stage, which aims to evaluate the effect of Plasma Activated Water (PAW) as an innovative strategy for controlling bacterial biofilms on stainless steel surfaces of relevance to the food industry.

**Keywords:** Biofilm; stainless steel; food industry

## Introducción

El agua subterránea constituye una importante fuente de abastecimiento para consumo humano, producción agropecuaria e industria alimentaria. En Argentina, este recurso es ampliamente utilizado por establecimientos agropecuarios, donde la infiltración de materia fecal de origen animal favorece la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal, como *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* (Urseler et al., 2019), comprometiendo la inocuidad de los alimentos y la seguridad de los procesos productivos (Lutri et al., 2020). Además de sobrevivir en el agua, estos microorganismos pueden adherirse a distintas superficies y formar biofilms, estructuras que incrementan su tolerancia frente a agentes antimicrobianos y dificultan la limpieza y desinfección debido a la presencia de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (Extracellular Polymeric Substances, EPS), dificultando la penetración de agentes antimicrobianos y favoreciendo la persistencia y recolonización de las superficies (Flemming et al., 2016; Zhao et al., 2023).

La formación de biofilms sobre materiales utilizados en la industria alimentaria representa un problema de gran interés debido a que estas comunidades microbianas pueden constituir reservorios persistentes de contaminación. El acero inoxidable AISI 304L, ampliamente utilizado por sus propiedades mecánicas e higiénicas, no impide la adhesión bacteriana bajo condiciones favorables. Diversas estrategias físicas, químicas y de modificación superficial han demostrado eficacia para controlar la formación de biofilms, mejorar la desinfección y reducir el riesgo de contaminación en las instalaciones de procesamiento de alimentos (Dawan et al., 2025).

En los últimos años, el agua activada por plasma (Plasma Activated Water, PAW) ha surgido como una alternativa innovadora para el control microbiológico debido a la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Reactive Oxygen and Nitrogen Species, RONS), capaces de producir daño oxidativo sobre células bacterianas y componentes de la matriz del biofilm (Xia et al., 2025). El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la formación de biofilms de *E. coli* y *E. faecalis* bajo distintas condiciones y superficies de materiales, como etapa previa para futuros ensayos en la determinación del efecto del PAW, tanto sobre bacterias en estado planctónico como sobre la formación y erradicación de biofilms en acero inoxidable.

## Desarrollo

### Materiales:

Acero inoxidable: Chapas de acero AISI 304L con terminación superficial 2B (ASTM International, 2025) de 0,9 x 0,9cm, obtenidas a partir de una única placa mediante corte por chorro de agua. Previamente a su utilización, las muestras fueron limpiadas por ultrasonido en agua ultrapura Tipo I (ASTM D1193) durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, manipuladas con pinzas esterilizadas a la llama, rociadas con acetona y esterilizadas por calor seco en estufa a 190 °C durante 60 min.

**Vidrio:** Tubos de ensayo de vidrio borosilicato, empleados por ser una superficie que permite visualizar fácilmente la adhesión bacteriana mediante la tinción con cristal violeta.

**Poliestireno:** Placas de poliestireno de 24 pocillos (multiwell), con tratamiento superficial para cultivo celular (tissue culture-treated) de fondo plano, empleadas por corresponder al material utilizado en el método de cristal violeta, permitiendo cuantificar la biomasa adherida.

**Ensayos microbiológicos:**

**Cultivo de microorganismos:** Se utilizaron cepas puras de *E. coli* (ATCC 25922) y *E. faecalis* (ATCC 29212), mantenidas en placas con agar Luria-Bertani (LB) a 4 °C y conservadas a -80 °C para almacenamiento a largo plazo. Los cultivos *overnight* (ON) se prepararon en 5 ml de caldo LB, se incubaron con agitación (150 rpm) a 30 °C durante 12 h hasta alcanzar la fase exponencial (DO<sub>600</sub> de 0,566 para *E. coli* y 0,469 para *E. faecalis*). Las curvas de crecimiento se realizaron inoculando una alícuota del preinóculo en 30 mL de caldo LB contenidos en matraces Erlenmeyer, ajustando la concentración inicial a una densidad óptica de DO<sub>600</sub> de 0,01 ( $\approx 1 \times 10^6$  UFC/mL). Los ensayos se realizaron por triplicado. El crecimiento bacteriano se evaluó mediante turbidimetría (DO<sub>600</sub>) y recuento de células viables (UFC/mL) por siembra en superficie tras diluciones seriadas decimales mediante la técnica de microgota.

**Cinética de crecimiento:** Los parámetros cinéticos, tiempo generacional (g) y velocidad instantánea de crecimiento ( $\mu$ ), se calcularon mediante regresión lineal del tramo exponencial de las curvas de crecimiento; y mediante las ecuaciones 1 y 2 (Muloiwaet al., 2020) N1 y N2 corresponde a las UFC a t1: inicio de la fase exponencial y t2: fin de la fase exponencial.

$$g = \frac{t}{n} \quad (1)$$

$$\mu = 2,303 \frac{\log N2 - \log N1}{(t2 - t1)} \quad (2)$$

dónde t: tiempo de crecimiento exponencial, n: número de generaciones, N1 y N2: UFC en los tiempos t1 y t2.

**Ensayo de formación de biofilm por tinción con cristal violeta:** La capacidad de formación de biofilms de *E. coli* y *E. faecalis* se evaluó mediante tinción con cristal violeta para determinar la biomasa adherida (Merritt, et al., 2011) sobre superficies de vidrio, poliestireno y acero inoxidable AISI 304L. Con el objetivo de analizar la influencia de la disponibilidad de nutrientes sobre la formación de biofilms, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de glucosa adicionadas al medio de cultivo, así como distintos tiempos de incubación sobre las superficies de poliestireno y acero inoxidable, utilizando las condiciones que se muestran en la Tabla 1.

| Superficies materiales | Tiempo (h) | Concentración de Glucosa (%) |
|------------------------|------------|------------------------------|
| Poliestireno           | 48         | 0;0,25;0,75 Control (LB)     |
| Poliestireno           | 120        | 0;0,50;0,75 Control (LB)     |
| Acero inoxidable       | 48         | 0;0,50;0,75 Control (LB)     |

Tabla 1. Condiciones experimentales de formación de biofilms de *E. coli* y *E. faecalis* sobre poliestireno y acero inoxidable.

**Inóculo:** Los inóculos se prepararon siguiendo el mismo procedimiento descripto para las curvas de crecimiento. A diferencia de dicho ensayo, la incubación se realizó en condiciones estáticas a 28 °C.

**Siembra en microplaca:** Para cada especie se seleccionó el cultivo que presentó la mayor densidad óptica (DO<sub>600</sub>). La formación de biofilms se realizó en microplacas de poliestireno de 24 pocillos, adicionando en cada pocillo 1000  $\mu$ L de medio LB suplementado con la concentración de glucosa correspondiente y 50  $\mu$ L del cultivo bacteriano (dilución final 1/20). Las microplacas se incubaron en condiciones estáticas a 28 °C durante los tiempos experimentales establecidos.

**Tinción con cristal violeta:** Finalizado el período de incubación, se retiró el medio y las superficies se lavaron con agua destilada para eliminar las células no adheridas. Las muestras se fijaron en estufa a 60 °C durante 60 min. La biomasa adherida se tiñó mediante la adición de 1000  $\mu$ L de una solución de cristal violeta al 0,1 % durante 15 min a temperatura

ambiente. Luego, las superficies se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar *overnight* a temperatura ambiente. La formación de biofilms se evaluó mediante análisis cualitativos y cuantitativos.

**Cualitativo:** La formación de biofilms se determinó visualmente mediante el registro fotográfico de la coloración residual retenida sobre las superficies después del proceso de tinción.

**Cuantitativo:** Una vez secas, las superficies teñidas se sometieron a la solubilización del cristal violeta mediante la adición de 1000  $\mu\text{L}$  de etanol al 96 %, dejándolo actuar durante 40 min. La biomasa adherida se cuantificó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 570 nm ( $\text{DO}_{570}$ ) utilizando un espectrofotómetro.

## Resultados

**Curvas de crecimiento:** La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento de *E. coli* y *E. faecalis* obtenidas mediante la determinación de la densidad óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) y el recuento de células viables (UFC/mL). En ambos casos se observó una fase exponencial claramente definida, seguida por la transición hacia la fase estacionaria.

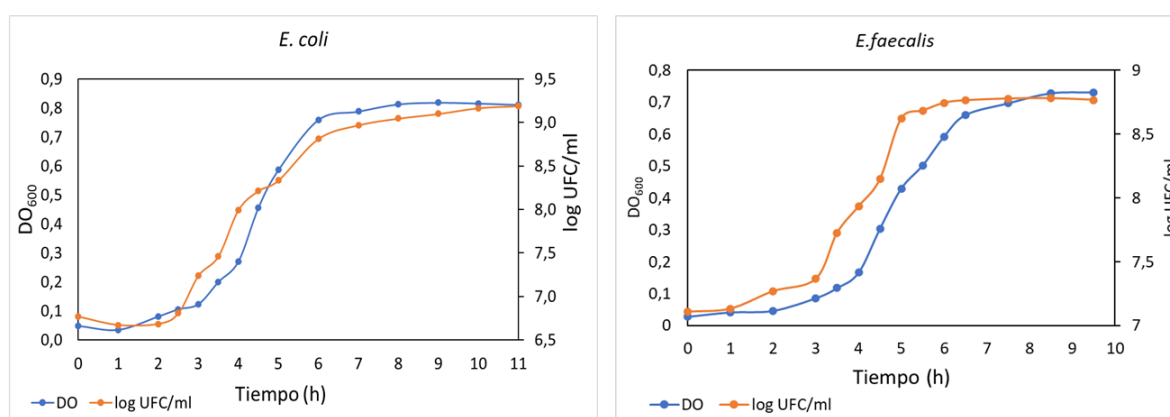


Figura 1. Curvas de crecimiento de *E. coli* y *E. faecalis*

La Tabla 2 presentan los parámetros cinéticos de crecimiento de *E. coli* y *E. faecalis*, determinados a partir de la regresión lineal del tramo exponencial de las curvas de crecimiento ( $R^2 > 0,95$ ). *E. coli* presentó una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de  $1,2 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo generacional de 34 min, mientras que *E. faecalis* mostró una velocidad específica de crecimiento de  $1,4 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo generacional de 30 min, respectivamente. Estos parámetros permitieron definir las condiciones de cultivo e identificar la fase de crecimiento exponencial para la preparación de los inóculos e interpretar el comportamiento de ambas especies durante las etapas iniciales de colonización de superficies, garantizando la reproducibilidad de los ensayos posteriores de formación de biofilms.

| Parámetros                                            | <i>E. coli</i> | <i>E. faecalis</i> |
|-------------------------------------------------------|----------------|--------------------|
| t1 y t2 (Ec. 2) en h                                  | 3,0 – 6,0      | 3,5 – 5,0          |
| Tiempo generacional (g) min                           | 34             | 30                 |
| Velocidad instantánea de crecimiento ( $\mu$ ) en 1/h | 1,21           | 1,38               |

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de *E. coli* y *E. faecalis*

**Formación de biofilms por tinción con cristal violeta:** El estudio cualitativo de formación de biofilms se ilustra en la Figura 2. La retención de cristal violeta sobre vidrio, poliestireno y acero inoxidable AISI 304L, tras 48 h de incubación, confirmó la capacidad de *E. coli* y *E. faecalis* para adherirse y formar biofilms en las tres superficies evaluadas.

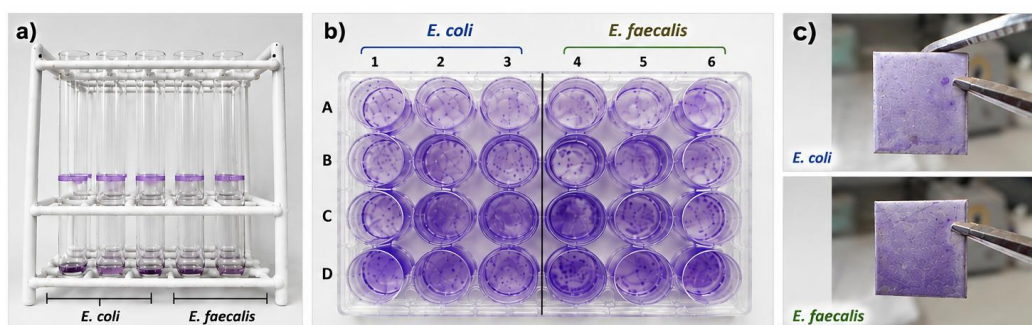


Figura 2. Formación de biofilms sobre las superficies. a) vidrio. b) placas de poliestireno. c) chapas de acero inoxidable.

### Estudio cuantitativo de formación de biofilm:

**Etapla 1. Cuantificación por DO<sub>570</sub> sobre acero inoxidable:** Como etapa preliminar, se cuantifico la biomasa adherida sobre acero inoxidable mediante la técnica de cristal violeta, utilizando una concentración de glucosa del 0,75 % y un tiempo de incubación de 48 h. Los resultados confirmaron que ambas especies formaron biofilms sobre acero inoxidable, con valores de DO<sub>570</sub> de  $0,13 \pm 0,05$  para *E. coli* y  $0,19 \pm 0,02$  para *E. faecalis*, indicando una mayor producción de biomasa adherida y una menor variabilidad entre las réplicas experimentales de esta última.

**Etapla 2. Efecto de la glucosa, tiempo de incubación y superficie:** La Tabla 3 presenta los valores medios de DO<sub>570</sub> obtenidos para *E. coli* y *E. faecalis* sobre poliestireno y acero inoxidable AISI 304L, bajo diferentes concentraciones de glucosa y tiempos de incubación. Se incluyen control con medio LB. s/e: condición sin ensayo.

| Concentración de Glucosa (%) | Poliestireno      |                    |                 |                    | Acero inoxidable  |                    |
|------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|--------------------|-------------------|--------------------|
|                              | 48 h              |                    | 120 h           |                    | 48 h              |                    |
|                              | <i>E. coli</i>    | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli</i>  | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli</i>    | <i>E. faecalis</i> |
| <b>0,00 %</b>                | $0,111 \pm 0,001$ | $0,16 \pm 0,02$    | $0,06 \pm 0,01$ | $0,10 \pm 0,02$    | $0,10 \pm 0,02$   | $0,061 \pm 0,004$  |
| <b>0,25 %</b>                | $0,16 \pm 0,02$   | $0,21 \pm 0,03$    | s/e             | s/e                | s/e               | s/e                |
| <b>0,50 %</b>                | s/e               | $0,275 \pm 0,003$  | $0,14 \pm 0,02$ | $0,25 \pm 0,03$    | $0,11 \pm 0,03$   | $0,21 \pm 0,01$    |
| <b>0,75 %</b>                | $0,27 \pm 0,03$   | $0,25 \pm 0,03$    | $0,18 \pm 0,04$ | $0,26 \pm 0,03$    | $0,16 \pm 0,02$   | $0,22 \pm 0,03$    |
| <b>Control (LB)</b>          | $0,15 \pm 0,04$   |                    | $0,07 \pm 0,02$ |                    | $0,064 \pm 0,002$ |                    |

Tabla 3. Valores medios de DO<sub>570</sub> (media  $\pm$  DE) de *E. coli* y *E. faecalis* en microplacas de poliestireno y en acero inoxidable.

Los resultados evidencian que ambos microorganismos fueron capaces de formar biofilms en todas las condiciones evaluadas y que el agregado de glucosa favorece su formación. En *E. coli*, la biomasa aumentó con la concentración de glucosa, alcanzando un máximo al 0,75 %, en concordancia con el papel de este carbohidrato en la producción de matriz extracelular (Cáceres et al., 2019; García-Gómez et al., 2016). En *E. faecalis* presentó una respuesta diferente, en ausencia de glucosa, la formación de biofilm fue baja, pero la suplementación generó un incremento con valores superiores a los de *E. coli*. Este patrón indica que, si bien *E. faecalis* requiere glucosa para optimizar la producción de biofilm, una vez estimulada, su capacidad de adhesión sería más robusta y estable, en concordancia con reportes que destacan la alta capacidad de esta especie para persistir en superficies abióticas y en ambientes hostiles (Mohamed & Huang, 2007). No se observaron diferencias relevantes entre las superficies evaluadas. En poliestireno, el biofilm de *E. coli* disminuyó con el tiempo de incubación, mientras que *E. faecalis* no mostró variaciones significativas. El efecto del tiempo de incubación sobre acero inoxidable será evaluado en una etapa posterior.

## Conclusiones

La caracterización cinética de *E. coli* y *E. faecalis* permitió identificar la fase exponencial, con velocidades específicas de crecimiento de  $1,2 \text{ h}^{-1}$  y  $1,4 \text{ h}^{-1}$  y tiempos generacionales de 34 y 30 min, respectivamente, proporcionando información de base para la estandarización de los inóculos. Los ensayos de formación de biofilms confirmaron la capacidad de ambas especies para adherirse y formar biofilms sobre vidrio, poliestireno y acero inoxidable AISI 304L. La suplementación del

medio con glucosa favoreció la formación de biofilms, con una mayor dependencia de su concentración en *E. coli*, mientras que *E. faecalis* presentó niveles de biomasa más estables una vez suplementado el medio. Los resultados obtenidos permitieron establecer un protocolo experimental reproducible para la formación de biofilms sobre acero inoxidable AISI 304L, definiendo como condiciones óptimas la incubación a 28 °C en medio LB suplementado con 0,75 % de glucosa durante 48 h. Este protocolo constituye la base metodológica para la siguiente etapa del proyecto, orientada a evaluar el efecto del PAW sobre biofilms bacterianos desarrollados en superficies metálicas de interés para la industria y los sistemas de distribución de agua.

## Utilización de IA generativa / herramientas IA

Declaro la utilización de IA ChatGPT como herramienta de apoyo para la revisión de estilo y redacción del manuscrito.

## Referencias

- ASTM International, (2025). Standard Specification for General Requirements for Flat-Rolled Stainless and Heat-Resisting Steel Plate, Sheet, and Strip (ASTM A480/A480M-25b). doi: 10.1520/A0480\_A0480M-25B
- Cáceres, M., Etcheverría, A., Padola, N., (2019). Efectos del medio de cultivo y de la metodología aplicada sobre la formación de biopelículas de 2 cepas de *Escherichia coli* diarreagénicas, Revista Argentina de Microbiología, Vol 51 (3). doi:10.1016/j.ram.2018.04.007.
- Dawan, J., Zhang, S., Ahn, J. (2025) Recent Advances in Biofilm Control Technologies for the Food Industry. Antibiotics, 14, 254. doi.org/10.3390/antibiotics14030254
- Flemming, H., Wingender, J., Szewzyk, U., Scott, P., Rice, A., Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology volume 14, pages 563–575. doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94
- García-Gómez, E., Espinosa, J., de la Cruz, F., Delgado, A. (2016). Role of carbon sources in biofilm formation by *Escherichia coli*. Journal of Basic Microbiology, 56(10), 1138–1148. doi:10.1002/jobm.201600123
- Lutri, V., Matteoda, E., Blarasin, M., Aparicio, V., Giacobone, D., Maldonado, L., Becher Quinodoz, F., Cabrera, A., Giuliano Albo, J. (2020). Hydrogeological features affecting spatial distribution of glyphosate and AMPA in groundwater and surface water in an agroecosystem. Córdoba, Argentina, Science of The Total Environment, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134557.
- Merritt, J.H., Kadouri, D.E., O'Toole, G.A. (2011). Growing and Analyzing Static Biofilms. Current Protocols in Microbiology, 22: 1B.1.1-1B.1.18. doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s22
- Mohamed, J. A., & Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by Enterococci. Journal of Medical Microbiology, 56(12), 1581–1588. doi:10.1099/jmm.0.47331-0
- Muloiwa, M., Nyende-Byakika, S., Dinka, M. (2020). Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models., South African Journal of Chemical Engineering, doi:10.1016/j.sajce.2020.07.006.
- Urseler, N., Bachetti, R., Damilano, G., Morgante, V., Ingaramo, R., Saino, y otros. (2019). Calidad microbiológica del agua subterránea en establecimientos agropecuarios del centro-sur de Córdoba, Argentina: aptitudes y usos. doi: 10.20937/RICA.2019.35.04.06
- Xia, B., Kumari Nilesh Vyas, H., Rice, S., Newsome, T., Cullen, P., Mai-Prochnow, A. (2025). Antimicrobial mechanism of in-situ plasma activated water treatment of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms. doi.org/10.1016/j.biofilm.2025.100303.
- Zhao, A., Sun, J. & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. Front. Cell. Infect. Microbiol. 13:1137947. doi: 10.3389/fcimb.2023.1137947