XI WORKSHOP. MÉTODOS RÁPIDOS Y AUTOMATIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

Uso de sensores de superficie y métodos rápidos para controlar la contaminación ambiental en las industrias alimentarias: hacia el control *on line*

Vanessa Montañez Izquierdo
Abel G. Ríos Castillo
Fabio Fontecha Umaña
José Juan Rodríguez Jerez

Grupo de investigación Biorisc – GRISC. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193. Bellaterra (Barcelona). josejuan.rodriguez@uab.es

1. Introducción

Las técnicas rápidas son métodos de análisis cuyo objetivo fundamental es el de ahorrarnos tiempo, es decir, conseguir que los resultados sean obtenidos de forma rápida, para alcanzar el objetivo final de tomar decisiones sobre la seguridad y/o calidad de los alimentos que se están elaborando. Cuanto más rápido sea el resultado, tanto más interesante será.
A este principio sólo hay que hacerle una salvedad, la fiabilidad del método. De forma que es realmente difícil de explicar que en muchas ocasiones el método rápido es más preciso y comete menos errores que el método tradicional. Uno de los motivos, que nos parece más importante, es que el método tradicional nos permite ver y "tocar" los microorganismos. Normalmente los ponemos en evidencia en multitud de medios de cultivo y los podemos aislar, teñir e identificar con relativa facilidad pero con mucho tiempo. Sin embargo, si aplicamos medidas de tipo eléctrico, inmunológico, genético, etc, los diferentes sistemas nos dan señales que hay que interpretar, de forma que los microorganismos suponemos que están ahí, pero se complica el poder ponerlos de manifiesto.
La importancia de la contaminación de superficies, en relación con la transmisión potencial de microorganismos patógenos a los alimentos, es más que evidente en el procesado de los alimentos (Vogel et al., 1997), en los comedores colectivos y en el entorno doméstico (Kusumaningrum et al., 2003). Muchos de los microorganismos patógenos y de alteración son capaces de adherirse a las superficies de contacto con los alimentos (Vogel et al., 1997), pudiendo ser viables, incluso, después de los procesos de higienización (Frank y Koffi, 1990; Reij y Den Aantrekker, 2003). Estas bacterias adheridas pueden despegarse durante la producción y contaminar los alimentos, cuando éstos entran en contacto con las superficies contaminadas.
Este hecho puedo afectar seriamente la calidad y la seguridad de los alimentos procesados, y suponer un riesgo potencial para los consumidores, especialmente si la contaminación cruzada tiene lugar tras el paso de desinfección (Bagge-Ravn et al., 2003). Se han desarrollado estudios de investigación que han pretendido la supervivencia de patógenos potenciales en las superficies de trabajo. Algunos de ellos han demostrado que la supervivencia de *Yersinia* spp., *Enterococcus* spp. o *Aeromonas* spp., adheridas a superficies de vidrio y de acero inoxidable, es dependiente de la humedad relativa ambiental (Wirtanen y Mattila-Sandholm, 1993; Moretro et al., 2003; Rose et al., 2003). Otros estudios han señalado que varias bacterias, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp., pueden sobrevivir en las manos, esponjas, ropa, utensilios y monedas durante horas o días, después de un contacto inicial con los microorganismos y manteniendo condiciones de sequedad (Jiang y Doyle, 1999; Kusumaningrum et al., 2003).

Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son húmedas o después de un proceso de limpieza húmeda sin secado, los microorganismos, incluyendo los patógenos, pueden multiplicarse hasta niveles completamente inaceptables (Moretro et al., 2003). Además, algunas bacterias se adhieren a las superficies como una forma de supervivencia en la naturaleza y en los ecosistemas creados por la acción del hombre (Lindsay y Von Holy, 1999). Cuando una bacteria se adhiere a una superficie y la coloniza, manifiesta al momento una mayor resitencia a la acción de los desinfectantes químicos (Ronner y Wong, 1993; Sagripanti y Bonifacino, 2000) y un incremento en la producción de exopolisacáridos (Sutherland, 2001). A la comunidad microbiana que se forma se la denomina biofilm. Como se ha señalado, la presencia de biofilms causaré una contaminación posterior al procesado, conducente a una reducción de la vida comercial del lote fabricado y a una transmisión potencial de microorganismos patógenos (Allison y Gillbert, 1992; Carpentier y Cerf, 1993; Mittelman, 1998).
Se han descrito diferentes métodos para la detección y seguimiento de la carga microbiológica de las superficies. El método tradicional, en general, es barato y fácil de utilizar, aunque requiere una cierta carga de trabajo laboratorial y no consigue despegar las bacterias que están formando biofilm (Chmielewski y Frank, 2003). La microscopía de epifluorescencia directa (Direct epifluorescence microscopy - DEM) y análisis digital de la imagen es un método utilizado para el recuento de microorganismos viables y viables no revivificables que puede ser realizado en 15 minutos (Fuster-Valls et al., 2008). Este tipo de técnica proporciona siempre recuentos más elevados que los resultados tras el cultivo y enumeración en placa, siendo, como mínimo, superiores en un orden de magnitud logarítmica (Boulos et al., 1999; Fuster-Valls et al., 2008; Montañez-Izquierdo et al., 2012). Esto se puede deber a que las bacterias no crecen bajo las condiciones de cultivo *in vitro* o que una gran cantidad de microorganismos quedan adheridos a las superficies tras el escobillonado (Wirtanen y Mattila-Sandholm, 1993; Griffiths, 1997; Chmielewski y Frank, 2003; Fuster-Valls et al., 2008; Montañez-Izquierdo et al., 2012). Multitud de estudios han demostrado que tras la adhesión microbiana y la formación de un biofilm, o bien, después de un estrés externo como un choque osmótico, térmico o desinfección, los microorganismos son capaces de entrar en un estado viable pero no cultivable, que es reversible (Griffith et al., 1995; Caro et al., 1999; Fuster-Valls et al., 2008; Montañez-Izquierdo et al., 2012). Por ello, se puede afirmar que una bacteria no muere sino que queda en estado durmiente o latente, pero su estado fisiológico es reversible y los patógenos mantendrán su virulencia. Estas células latentes no se detectan por cultivo, pero continúan representando un riesgo (Robine et al., 2002; Fuster-Valls et al., 2008).
El muestreo de superficies es obligatorio para la industria, con la finalidad de controlar y prevenir la contaminación cruzada entre superficies y alimentos. Nuestros objetivos van en la vía de asegurar un control real de las superficies, no una estimación. Por ello, ayudamos a desarrollar unas superficies de muestreo y análisis. Dado que la mayoría de las superficies higiénicas industriales son metálicas, el material de elección es el acero inoxidable. A este sistema le llamamos SCH o sensores de superficie. Estos sensores actúan como muestreadores en continuo y garantizan el análisis directo de las superficies. Para su uso, es necesario adherirlos a la superficie a muestrear, con la finalidad de fijarlos y evitar que caigan. Esta fijación se realiza por soldadura.
En este estudio comparamos la posibilidad del uso de SCH como muestreador en continuo y una cuantificación posterior mediante detección de ATP, comparado con el recuento tradicional en placa.

2. Materiales y métodos

2.1. Marcado de puntos críticos

Para la determinación de los puntos críticos donde realizar el muestreo de las superficies, en primer lugar, se procede a su detección mediante el empleo del producto bioFinder (iTram, Vic). Este producto consigue, mediante una reacción enzimática, desprender peróxido de hidrógeno, que es descompuesto

hasta la formación de oxígeno gas. Este gas es retenido en un espesante, formando una espuma claramente visible. Este reactivo nos permite marcar las zonas donde hay actividad microbiana en cualquier superficie, detectando los puntos de la instalación donde se formarán biofilms.
Una vez localizados los puntos críticos, se adhieren las bases a estas zonas por soldadura, se fijan los imanes y se colocan los sensores, pudiendo hacer el muestreo en continuo de estas áreas. Estos soportes o chips, son estructuras constituidas por una aleación de metal (acero) con un diámetro de 2 cm y un grosor de 1 mm. Todo el material se esteriliza previamente, bien por desinfección química con alcohol isopropílico o por autoclavado a 120ºC durante 20 minutos.
Los discos de muestreo se fijan a las bases metálicas por acción de imanes. Por este motivo, el muestreador es fuertemente fijado y se evita su caída. La retirada sólo será posible tras una presión intensa en el punto de recogida.

2.2. Colocación de los SCH

Se han seleccionado diferentes tipos de instalaciones alimentarias considerando diferentes condiciones ambientales y de trabajo.

- Un matadero, debido a su elevada humedad, elevada cantidad de materia orgánica en las instalaciones y una variedad importante de microorganismos en las instalaciones.
- Sala de despiece, debido a lo similar con la anterior, pero con condiciones de temperatura controlada, así como niveles de contaminación ambiental inferiores.
- Planta de proceso de leche, por la menor contaminación, producto permanentemente en área cerrada y contaminación por manipuladores y ambiente.

Todos los análisis se han realizado in las condiciones habituales de trabajo, sin inoculaciones ni manipulación laboratorial alguna.

2.3. Toma de muestra

En la zona inferior de la base metálica se encuentra la zona de toma de muestra. Aplicando presión en este punto con un asa de siembra estéril, se produce una separación de parte del sensor, por lo que puede ser tomado con unas pinzas estériles.
El disco, se coloca en un frasco con 3g de perlas de vidrio de 2-3 mm de diámetro y con capacidad para unos 25 ml de diluyente.

2.4. Análisis microbiológico

Al frasco con las perlas de vidrio se le añaden 10 ml de un diluyente sin influencia en el ATP ni sobre la presión osmótica de los microorganismos. Entre ellos podemos destacar la solución salina isotónica o similares.
El conjunto se homogeneiza durante 1 minute, para asegurar un efecto de fricción de las perlas en la superficie del disco. Esto permite la separación de los microorganismos y su paso al diluyente, de acuerdo con la norma ISO 13697.
Para la determinación del ATP se utilizaron kits de 3M de análisis de ATP total en agua. Tras la homogeneización, se introduce una tira para ATP total en el frasco con el diluyente, realizando suaves movimientos para asegurar una toma de muestra correcta. Posteriormente, se inserta el kit dentro del contenedor de reactivos y se realiza una lectura inmediata, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El resultado se obtiene en RLU o unidades realativas de luz.

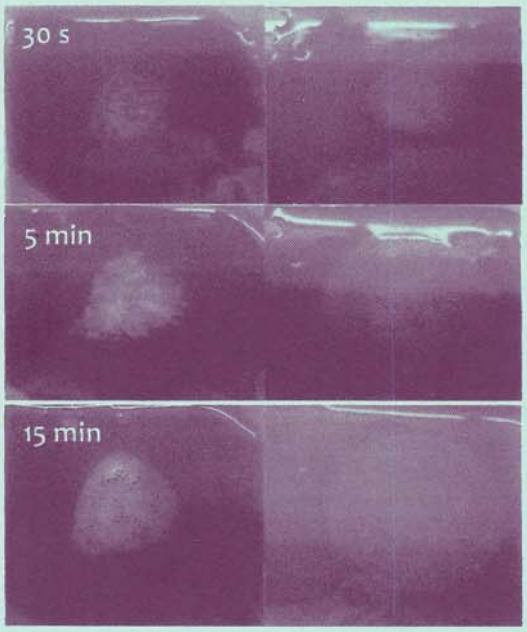
Para el recuento tradicional, se realizó un análisis microbiológico pipeteando alícuotas de 1 ml en placas de PCA (bioMérieux). Previamente, se realizaron diluciones decimales en agua de peptona tamponada (bioMérieux). Las placas se incubaron a 30ºC durante 48-72 horas.
Para la detección de patógenos, es posible tomar 1 ml de la solución de extracción, procediendo al análisis directos por la técnica de PCR en tiempo real. Ya que en el caso de tener un biofilm de un patógeno concreto, sería posible su detección en menos de 2 horas.

3. Resultados

3.1. Marcado de puntos críticos

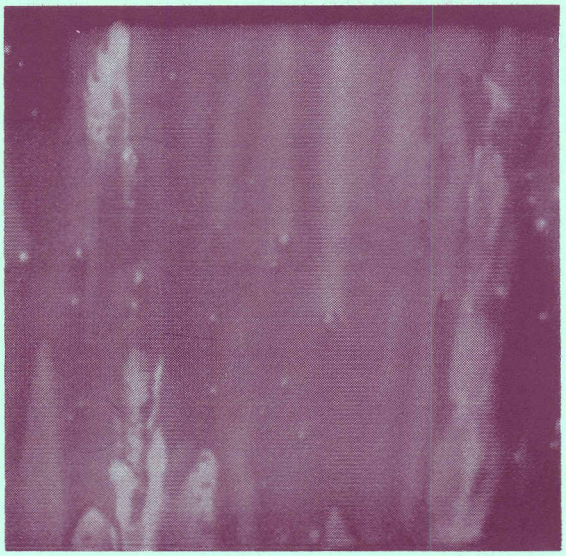
Como se puede ver en la siguiente imagen, el marcado de las superficies horizontales es fácil y claro. Después de un tiempo de contacto de 5 segundos, se empiezan a ver las primeras burbujas. A los 30 segundos la marca es evidente y si esperamos hasta 15 minutos, la formación de espuma es tan clara que sobresale de la superficie quedando marcado de forma evidente.

Figura 1. Marcado de superficies con reactivo enzimático, tras un período de contacto de 30 segundos, 5 y 15 minutos. En las imágenes se puede ver el resultado con la presencia de colorante marcador (color naranja) y sin colorante (color gris)



Como podemos apreciar, el colorante permite destacar la reacción positiva, siendo posible su visualización a larga distancia.
Las superficies a las que se les aplica el mismo reactivo, pero sin colorante alguno, se puede poner de manifiesto la positividad, pero el efecto es mucho menos evidente.
Por todo ello, el reactivo bioFinder permite poner de manifiesto la presencia de agregados microbianos de forma rápida y fácil.

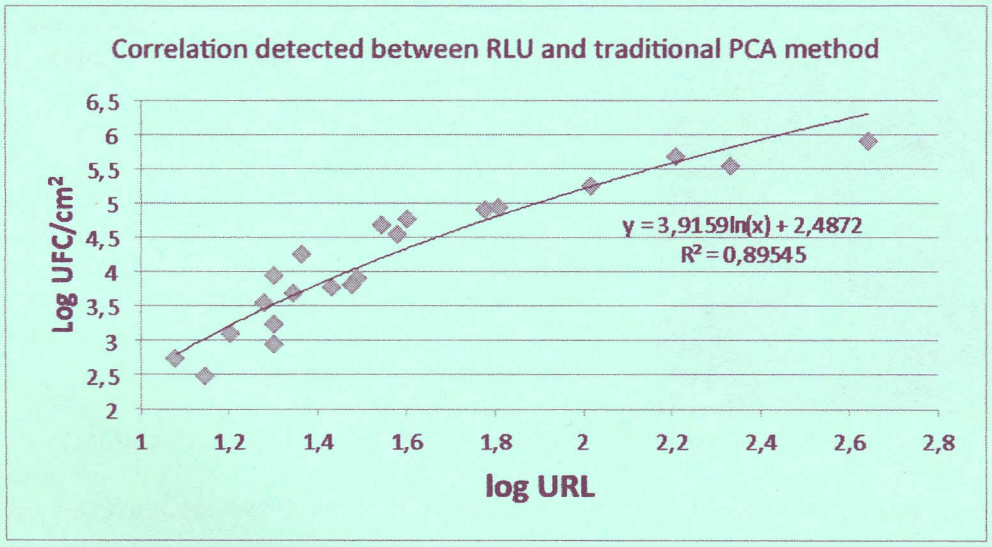
Al mismo tiempo, en el caso de las superficies verticales, la detección es igualmente evidente.



En esta figura vemos cómo en superficies verticales se nos quedan marcados los puntos de contaminación mayoritaria, lo que igualmente nos permitirá la detección de los puntos de control críticos.

3.2. Cuantificación por ATP

En la siguiente gráfica se muestra la relación existente entre los recuento obtenidos mediante el empleo de sensores de superficie y ATP, meidante una estudio de correlaión de Pearson y el subsigueinte análisis de la regresión.



Como se puede observar, detectamos una relación logarítmica entre 2,5 y 6 log(ufc/cm^2) en las instalaciones estudiadas. La correlación observada ha sido de 0,95, con un coeficiente de determinación del 89,54%.

4. Conclusión

Es posible el marcado de los puntos de control crítico en instalaciones alimentarias y la cunatificación de la contaminación en las superficies mediante el empleo de un reactivo adecuado, como bioFinder, y una cuantificación del número de microorganismos mediante el análisis del ATP total sobre sensores de superficie SCH.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Allison, D. G., y Gillbert, P. (1992). Bacterial biofilms. Science Progress, 76, 305–321.
- Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L., y Vogel, B. F. (2003). Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection, 66, 592–598.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., y Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD BacLightTM: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. Journal of Microbiological Methods, 37, 77–86.
- Caro, A., Got, P., Lesne, J., Binard, S., y Baleux, B. (1999). Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable Salmonella typhimurium. Applied and Environmental Microbiology, 65, 3229–3232.
- Carpentier, B., y Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. Journal of Appied. Microbiology, 75, 499–511.
- Chmielewski, R. A. N., y Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2, 22–32.
- Frank, J. F., y Koffi, R. A. (1990). Surface adherent growth of Listeria monocytogenes is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. Journal of Food Protection, 53, 550–554.
- Fuster-Valls N, Hernández-Herrero M., Marín-de-Mateo M y Rodríguez-Jerez J.J. (2008). Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. Food Control, 19, 308–314.
- Griffith, C. J., Davidson, C. A., Peters, A. C., y Fielding, L. M. (1997). Towards a strategic cleaning assessment programme: hygiene monitoring and ATP luminometry, and options appraisal. Food Science Technolology Today, 11, 15–24.
- Griffiths, M. W. (1997). Rapid Microbiological methods with hazard analysis critical control points. Journal of AOAC International, 80, 1143–1150.
- Jiang, X. P., y Doyle, M. P. (1999). Fate of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enteritidis on currency. Journal of Food Protection, 62, 805–807.
- Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C., y Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. International Journal of Food Microbiology, 85, 227–236.
- Lindsay, D., y Von Holy, A. (1999). Different responses of planktonic and attached Bacillus subtilis and Pseudomonas fluorescens to sanitizer treatment. Journal of Food Protection, 62, 368–379.
- Montañez-Izquierdo V.Y., Salas-Vázquez D.I. y Rodríguez-Jerez J.J. (2012). Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling Listeria monocytogenes biofilms on stainless steel surfaces. Food Control, 23, 470-477.
- Mittelman, M.W. (1998). Symposium: biofilms: development and control. Journal of Dairy Science, 81, 2760–2763.
- Moretro, T., Hermansen, L., Holck, A. L., Sidhu, M. S., Rudi, K., y Langsrud, S. (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus ica among Staphylococci from food and food processing environments. Applied and Environmental Microbiology, 69, 5648–5655.
- Reij, M. W., y Den Aantrekker, E. D. (2003). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Forceb 2003-12-31.
- Robine, E., Boulange´-Petermann, L., y Derange`re, D. (2002). Assessing bactericidal properties of materials: the case of metallic surfaces in contact with air. Journal of Microbiological Methods, 49, 225–234.
- Ronner, A. B., y Wong, A. C. L. (1993). Biofilm development and sanitizer inactivation of Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium on stainless steel and Buna-n rubber. Journal of Food Protection, 56, 750–758.
- Rose, L. J., Donlan, R., Banerjee, S. N., y Arduino, M. J. (2003). Survival of Yersinia pestis on environmental surfaces. Journal of Applied Environmental Microbiology, 2166–2171.
- Sagripanti, J. L., y Bonifacino, A. (2000). Resistance of Pseudomonas aeruginosa to liquid disinfectants on contaminated surfaces before formation of biofilms. Journal of AOAC International, 83, 1415–1422.
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology, 147, 3–9.
- Vogel, B. F., Jorgensen, K., Christensen, H., Olsen, J. E., y Gram, L. (1997). Differentiation of Shewanella putrefaciens and Shewanella alga on the basis of whole-cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16S rRNA gene sequence analysis. Applied and Environmental Microbiology, 63, 2189–2199.
- Wirtanen, G., y Mattila-Sandholm, T. (1993). Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne biofilm bacteria grown on stainless steel surfaces. Journal of Food Protection, 56, 678–683.