



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**SUPERVIVENCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
SOBRE SUPERFICIES DE CONTACTO CON  
ALIMENTOS: UN ABORDAJE MULTIDISCIPLINAR DE  
UN PROBLEMA COMPLEJO**

Carolina Ripollés Ávila

**Tesis Doctoral**

Memoria presentada al *Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat  
de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*

Para optar al grado de doctor en

**Ciencia de los Alimentos**

Trabajo dirigido por Dr. José Juan Rodríguez Jerez

Bellaterra, Junio de 2018



JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ, profesor titular del Área de Nutrición y Bromatología del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

HACE CONSTAR:

Que la memoria titulada “Supervivencia de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de contacto con alimentos: un abordaje multidisciplinar de un problema complejo”, presentada por Carolina Ripollés Ávila para optar al grado de Doctor por la “Universitat Autònoma de Barcelona”, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Bellaterra, a 14 de junio de 2018.

José Juan Rodríguez Jerez



*A mis padres, Rosa y Francesc*  
*A mi hermano, Manel*  
*A mi compañero de vida, Héctor*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera mostrar el más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. José Juan Rodríguez Jerez. Así que, a ti, Pepe, por darme la posibilidad de realizar este proyecto, por toda tu ayuda, soporte, ánimo y apoyo brindado a lo largo del tiempo. Gracias por ser mi maestro, por ser quien me ha hecho ansiar una carrera científica, quien me ha enseñado lo que es la verdadera pasión por el trabajo. Gracias por tu inestimable confianza. Gracias, en el mayor sentido de la palabra, por haber creído y apostado en mí.

A todo el equipo de despacho, Alfons, Abel, Fabio y Brayan, por ser buenos compañeros, ayudarme y aconsejarme en lo que he necesitado. Pero en especial, a ti, Anne-So. Gracias por tu apoyo incondicional, tu ánimo, cariño, ayuda y fuerza. De ti he podido aprender mucho, sobre todo lo que es la bondad, la valentía y el coraje.

A ti, Maria, porque tu llegada trajo tu sonrisa, tu ilusión y tu espíritu. Porque tu empuje me ha ayudado a seguir. Gracias por escucharme, por abrirme los ojos, por aclarar siempre mis ideas, por estar a mi lado durante todo este camino, por demostrarme que no importa el tiempo que hace que conoces a una persona para sentirse afortunada de tenerla. Gracias por ser mi confidente. Gracias, de todo corazón, por ser mi amiga.

A tu, Dolors, perquè no pot existir en aquest món una millor “jefa” de laboratori. Gràcies per tota la teva ajuda, el suport, la teva acollida, per oferir-me la teva tendresa, els teus consells. Gràcies per tots els moments en el “*Confessionari Dolors*”. Gràcies, de veritat, per haver-me recolzat.

A ti, Manoli, por tu contribución en mi desarrollo personal y profesional. Gracias por tu ayuda, por la infinidad de buenos consejos, por ser “*San Google Manoli*” y resolverme tantas y tantas dudas. Gracias por transmitirme tu energía y empeño. Gracias por ser parte de mi inspiración.

A tu, Teresa, gràcies pels teus consells, per haver-te preocupat per mi i haver-me encoratjat a seguir.

A tu, Josep, gràcies per tot el teu suport, pels ànims, per donar-me sempre la teva valuosa opinió. Gràcies pels teus diferents/diversos/varis consells, per tota la confiança dipositada en mi i per tenir sempre bones paraules. Gràcies, de veritat, per tota la teva ajuda.

Al resto de compañeros del departamento de Ciencia de los Alimentos así como de otros departamentos, por el camino junto a vosotros, por tantos buenos y grandes momentos durante estos años. Gracias por haberme acompañado en mi día a día y por haberme contagiado en algún momento con vuestra alegría.

A todas las amistades que he hecho a lo largo de mi vida. Gracias por todo vuestro cariño, vuestras buenas palabras, vuestro intenso apoyo, por regalarme sonrisas y felicidad.

A vosotras, Patri y Yoli, gracias por vuestro infinito soporte. Nos conocemos desde los tres años y desde entonces no nos hemos separado. Porque nos hemos visto crecer en todos los ámbitos de nuestras vidas, porque nos hemos reído, llorado, apoyado, animado y protegido. Porque os he sentido como hermanas. Porque os quiero.

A vosotros, Pascual y Juana Mari, gracias por haberme acogido como si de vuestra hija propia se tratara. Gracias por todo vuestro soporte, cariño, ánimo y valiosos consejos.

A mi familia, más querida, Isi, Angie, Miguel, Elvia, Natàlia y Dani. Porque no existe un amor más puro que el que tengo por vosotros. Gracias por tantos momentos, por estar junto a mí y respaldarme en todas mis decisiones. Gracias por hacerme feliz.

A mis abuelos, José, Roser, Geno y Dolores. Porque no se puede querer con tanta intensidad y respeto a alguien. Gracias por todo lo vivido. En especial a ti, yaya Dolores, porque aunque tu reciente marcha nos ha arrancado un trozo de nuestra alma, sigues en cada uno de nosotros, que hemos heredado lo mejor de ti, tu indiscutible manera de querer, tu indiscutible manera de vivir.

A ti, Manel, porque no puede haber un hermano mejor que tú. Gracias por apoyarme y ayudarme en todos los sentidos durante este tiempo. Admiro tu fuerza, tu coraje, tu manera de ser. Gracias por hacerme mejor persona. No te puedo querer más.

A mis padres, Rosa y Francesc. Soy todo lo que soy por lo que me habéis enseñado. Gracias por todo vuestro amor, cariño, afecto y generosidad. Gracias por haberme acompañado en todos mis logros, por impulsarme sin condición a alcanzar mis sueños. Gracias por mostrarme lo que es la dedicación, el esfuerzo y el valor, ya que todo ello me ha ayudado a conseguir finalizar este proyecto. Gracias por sacar lo mejor de mí en todo momento. Gracias por enseñarme lo que es la admiración por alguien. Os quiero.

A ti, Héctor, por ser mi compañero de vida. Gracias por ser la persona que está a mi lado cada día, el que batalla y me ayuda a conseguir lo que me propongo. Gracias por tu ánimo, tu cariño, tu amor. Gracias por creer y confiar en mí. Porque la suerte y el destino hizo que nos encontráramos y desde entonces hemos estado el uno al lado del otro, apoyándonos. Gracias por todo. Te quiero.



## RESUMEN

La inocuidad alimentaria es una de las principales preocupaciones con relación al desarrollo industrial de los alimentos. Esto se debe principalmente a las enfermedades de transmisión alimentaria, que son uno de los problemas más relevantes en el mundo contemporáneo y una causa importante, en cuanto a la reducción de la productividad económica. Una de las vías principales de contaminación microbiana de los alimentos son las superficies industriales, que son colonizadas por microorganismos patógenos capaces de formar biofilms, convirtiéndose en reservorios y en fuentes potenciales de contaminación cruzada.

El trabajo presente se engloba dentro del Proyecto Nacional SURLIS (RTA2014-00045-C03-03), un proyecto multidisciplinar que busca combatir uno de los problemas más importantes relacionados con la contaminación de superficies industriales, como son los biofilms. Concretamente, el proyecto se ha centrado en el estudio del patógeno con mayor porcentaje de mortalidad por transmisión alimentaria a nivel europeo, *Listeria monocytogenes*. Este patógeno tiene la capacidad de formar biofilms en cualquier tipo de superficie, lo que le confiere resistencia a los diferentes tratamientos de limpieza y desinfección aplicados en la industria alimentaria, habiendo consecuentemente, una mayor facilidad a transferirse desde superficies a alimentos.

Dada la perspectiva general del proyecto, así como la importancia del control de biofilms en la industria alimentaria, se procedió a realizar diferentes estudios enfocados a la evaluación de esta problemática. En primera instancia, se realizó un estudio para la determinación de la contaminación microbiana en diferentes superficies industriales de una industria cárnica, mediante la implementación de un sistema de muestreo a base de sensores. Los resultados obtenidos mostraron dos agrupaciones principales de zonas con mayor y menor grado de contaminación microbiológica, siendo los recuentos en microorganismos aerobios totales el grupo microbiano con mayor contribución. Se obtuvieron un total de cuatro presencias de *L. monocytogenes* a lo largo del muestreo.

En un segundo estudio se desarrolló un modelo, a escala de laboratorio, para la formación de biofilms de *L. monocytogenes* en su etapa madura sobre superficies de acero inoxidable, con el objetivo posterior de ser empleado como modelo *in vitro* y poder

estudiar su control y eliminación. En los resultados obtenidos se mostró que el mejor período inicial de incubación era de 48 horas, en comparación con el de 24 horas y 72 horas. El crecimiento máximo para la formación de biofilms, en las condiciones *in vitro* probadas, se obtuvo después de una semana de incubación, con diferentes lavados y renovación de nutrientes, con una cantidad total de células de 7,25 log (CFU cm<sup>-2</sup>) y una tasa de supervivencia celular de 94,47 %.

En tercera estancia, dado que el control de los biofilms presentes en la industria alimentaria es muy relevante para la salud pública, es completamente necesario encontrar métodos de cuantificación fiables y realistas. Por esta razón, en este tercer estudio se compararon cinco métodos de recuento distintos, que fueron el recuento convencional en placa, TEMPO, DEM, VIDAS y qPCR, para la cuantificación de biofilms de diferentes cepas de *L. monocytogenes* y un biodetector para la detección visual de biofilms en entornos industriales. Los resultados mostraron que, dependiendo de la producción de la matriz del biofilm, la recuperación de las células que conforman el mismo podía ser menor y, por lo tanto, si se emplea un método de cuantificación indirecto, los recuentos microbianos podrían subestimarse. Sobre el conjunto de cepas de *L. monocytogenes* empleadas, los métodos basados en el recuento de placa y TEMPO por una parte, y DEM y qPCR por la otra, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,998$ ;  $P = 0,508$ , respectivamente) y por tanto se realizaron también estudios de correlación.

En cuarto lugar, se estudió la eliminación de biofilms maduros de cepas salvajes de *L. monocytogenes* aisladas del primer estudio, con el objetivo de ver qué estrategia se debería seguir a nivel industrial para la eliminación de estas estructuras. Los resultados señalaron que la aplicación de productos enzimáticos como alternativa para su eliminación son realmente prometedores.

## RESUM

La innocuïtat alimentària és una de les principals preocupacions en relació al desenvolupament industrial dels aliments. Això és degut principalment a les malalties de transmissió alimentària, que són un dels problemes de salut més rellevants del món contemporani i una causa important, en relació a la reducció de la productivitat econòmica. Una de les vies principals de contaminació microbiana dels aliments són les superfícies industrials, que són colonitzades per microorganismes patògens capaços de formar biofilms, convertint-se en reservoris i, consegüentment, en fonts potencials de contaminació creuada.

El treball present s'engloba dins el Projecte Nacional SURLIS (RTA2014-00045-C03-03), un projecte multidisciplinari que busca combatre un dels problemes més importants relacionats amb la contaminació de superfícies industrials, com són els biofilms. Concretament, el projecte s'ha centrat en l'estudi del patogen amb major percentatge de mortalitat per transmissió alimentària a nivell europeu, *Listeria monocytogenes*. Aquest patogen té la capacitat de formar biofilms en qualsevol tipus de superfície, el que li confereix resistència als diferents tractaments de neteja i desinfecció aplicats en la indústria alimentària, havent consegüentment, una major facilitat a transferir-se des de les superfícies als aliments.

Donada la perspectiva general del projecte, així com la importància del control de biofilms en la indústria alimentària, es va procedir a realitzar diferents estudis enfocats a l'avaluació d'aquesta problemàtica. En primera instància, es va realitzar un estudi per a la determinació de la contaminació microbiana en diferents superfícies industrials d'una indústria càrnia mitjançant la implantació d'un sistema de mostreig a força de sensors. Els resultats obtinguts van mostrar dues agrupacions principals de zones amb major i menor grau de contaminació microbiològica, sent els recomptes en microorganismes aerobis totals el grup microbià amb major contribució. Es van obtenir un total de quatre presències de *L. monocytogenes* al llarg del mostreig.

En un segon estudi es va desenvolupar un model, a escala de laboratori, per a la formació de biofilms de *L. monocytogenes* en la seva etapa madura sobre superfícies d'acer inoxidable, amb l'objectiu posterior de ser emprat com a model *in vitro* i poder estudiar

el seu control i eliminació. En els resultats obtinguts es va mostrar que el millor període inicial d'incubació era el de 48 hores, en comparació amb el de 24 hores i 72 hores. El creixement màxim per a la formació de biofilms, en les condicions *in vitro* provades, es va obtenir després d'una setmana d'incubació, amb diferents rentats i renovació de nutrients, amb una quantitat total de cèl·lules de 7,25 log (CFU cm<sup>-2</sup>) i una taxa de supervivència cel·lular de 94,47 %.

En tercera estada, atès que el control dels biofilms presents en la indústria alimentària és molt rellevant per a la salut pública, és del tot necessari trobar mètodes de quantificació fiables i realistes. Per aquesta raó, en aquest tercer estudi es van comparar cinc mètodes de recompte diferents, que van ser el recompte convencional en placa, TEMPO, DEM, VIDAS i qPCR, per a la quantificació de biofilms de diferents soques de *L. monocytogenes* i un biodetector per a la detecció visual de biofilms en entorns industrials. Els resultats van mostrar que, depenent de la producció de la matriu del biofilm, la recuperació de les cèl·lules que conformen el mateix podia ser menor i, per tant, si es fa servir un mètode de quantificació indirecte, els recomptes microbians es podrien subestimar. Sobre el conjunt d'espècies de *L. monocytogenes* emprades, els mètodes basats en el recompte de placa i TEMPO per una banda, i DEM i qPCR per l'altra, no van presentar diferències estadísticament significatives ( $P = 0,998$ ;  $P = 0,508$ , respectivament) i per tant es van realitzar també estudis de correlació.

En quart lloc es va estudiar l'eliminació de biofilms madurs de soques salvatges de *L. monocytogenes* aïllades del primer estudi, amb l'objectiu de veure quina estratègia s'hauria de seguir a nivell industrial per a l'eliminació d'aquestes estructures. Els resultats van assenyalar que l'aplicació de productes enzimàtics com a alternativa per a la seva eliminació són realment prometedors.

**ABSTRACT**

Food safety is one of the biggest concerns of food industrial development. This is mainly related to foodborne diseases, which are one of the most relevant health problems in the contemporary world and an important cause of reduced economic productivity. One of the main sources of microbial contamination of food products are industrial surfaces, which are colonized by pathogenic microorganisms capable of forming biofilms, making surfaces to become reservoirs and potential sources of cross contamination to food products.

The present work is included in the National Project SURLIS (RTA2014-00045-C03-03), a multidisciplinary project that focuses in combating one of the most important problems regarding to the contamination of industrial surfaces, as biofilms are. The project has been centered in the study of the pathogen with the highest mortality rate at a European level, *Listeria monocytogenes*. This pathogen has the ability to form biofilms on any type of surface, which makes it confer resistance to the different cleaning and disinfection treatments applied in the food industry, having consequently, a more easy transfer from surfaces to food products.

Given the general perspective of the project, as well as the importance of the control of biofilms in food industry, it was proceeded to carry out different studies focused on the evaluation of this problem. In the first instance, a study was conducted to determine the microbial contamination on different industrial surfaces of a meat industry through the implementation of a sensor-based sampling system. The results obtained showed two main groups of zones with greater and lesser degree of microbiological contamination, being the total aerobic counts the microbial group with the highest contribution. A total number of four *L. monocytogenes* presences was obtained throughout sampling.

In a second study, a laboratory scale model to optimally form *L. monocytogenes* biofilms in their mature stage on stainless steel surfaces was developed, with the objective of being used as an *in vitro* model to further study its control and elimination. Results showed that the best initial incubation period was of 48 hours when compared with 24 hours and 72 hours. The maximum growth for biofilm formation in the *in vitro* conditions tested was

obtained after a week of incubation with different series of washing and nutrient renewal, with a total cell amount of 7.25 log (CFU cm<sup>-2</sup>) and a cell survival rate of 94.47 %.

In another instance, given the fact that the control of biofilms present in the food industry is very relevant to public health, it is completely necessary to find reliable and realistic methods for their quantification. For this reason, in this third study, a comparison was performed between five different counting methods, which were the conventional plate counting, TEMPO, DEM, VIDAS and qPCR, for the quantification of biofilms of different *L. monocytogenes* strains and a biodetector for detection and visualization of biofilms in industrial environments. Results showed that, depending on the biofilm matrix production, the recovery of cells that conform the biofilm could be lower and therefore, if an indirect quantification method is used microbial counts could be underestimated. Regarding all *L. monocytogenes* species used, the methods based on plate counting and TEMPO on the one hand, and DEM and qPCR on the other hand, did not show statistically significant differences ( $P = 0.998$ ,  $P = 0.508$ , respectively) and therefore correlation studies were also carried out.

Finally, the elimination of mature biofilms of wild strains of *L. monocytogenes* isolated from the first study was done in order to observe what strategy should be followed at an industrial level for the elimination of these structures. Results indicated that the application of enzymatic products as a promising alternative for their elimination.

## **Índice de contenidos**



---

<b>I. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Objetivos y plan de trabajo</b> .....	<b>5</b>
<b>III. Revisión bibliográfica</b> .....	<b>11</b>
1. Importancia de la seguridad alimentaria.....	<b>13</b>
2. Enfermedades transmitidas por los alimentos. Incidencia e impacto.....	<b>15</b>
3. Implicación de la contaminación cruzada en las ETAs.....	<b>18</b>
4. Superficies en la industria alimentaria .....	<b>20</b>
4.1. Propiedades de las superficies.....	<b>21</b>
5. <i>Listeria monocytogenes</i> , un patógeno emergente.....	<b>23</b>
5.1. Características generales .....	<b>23</b>
5.2. Descripción, incidencia e impacto de la listeriosis.....	<b>25</b>
5.3. Adhesión y transferencia .....	<b>26</b>
5.4. Persistencia.....	<b>28</b>
6. Biofilms .....	<b>29</b>
6.1. Proceso de formación de biofilms .....	<b>31</b>
6.1.1. Fijación reversible de células individuales a una superficie.....	<b>32</b>
6.1.2. Unión irreversible a la superficie.....	<b>33</b>
6.1.3. Formación de microcolonias.....	<b>33</b>
6.1.4. Maduración del biofilm .....	<b>34</b>
6.1.5. Disociación de las células y colonización de una nueva superficie .....	<b>35</b>
6.2. Ventajas para las células que conforman los biofilms .....	<b>36</b>
6.3. Matriz extracelular de biofilms compuestos por <i>L. monocytogenes</i> .....	<b>38</b>
6.4. Repercusión de los biofilms en la industria cárnica.....	<b>41</b>
7. <i>Quorum sensing</i> .....	<b>42</b>
7.1. Comunicación celular.....	<b>42</b>
7.2. <i>Quorum sensing</i> y calidad de los alimentos .....	<b>46</b>
8. Métodos para el control de la contaminación microbiológica de superficies en la industria .....	<b>47</b>
8.1. Muestreo de superficies.....	<b>48</b>
8.2. Detección <i>in situ</i> de la contaminación microbiológica de superficies .....	<b>49</b>
8.3. Cuantificación de la contaminación microbiológica de superficies.....	<b>51</b>
8.3.1. Métodos directos.....	<b>51</b>
8.3.2. Métodos indirectos.....	<b>52</b>

9. Higienización en la industria alimentaria. Una especial mención a la industria cárnica.....	56
9.1. Limpieza.....	57
9.2. Desinfección.....	59
9.3. Estrategias alternativas.....	60
9.3.1. Enzimas.....	60
9.3.2. Inhibidores de la comunicación de <i>quorum sensing</i> .....	62
9.3.3. Quitosano.....	63
<b>IV. Evaluación de la contaminación microbiológica de superficies mediante la implementación de sensores SCH en una planta de procesado de cerdo ibérico ....</b>	<b>65</b>
1. Materiales y métodos.....	67
1.1. Características de la planta de procesado.....	67
1.2. Superficies de trabajo.....	67
1.3. Plan de muestreo.....	70
1.4. Análisis microbiológico de las superficies de trabajo.....	71
1.5. Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> y tipificación.....	72
1.6. Análisis estadístico.....	73
2. Resultados y discusión.....	75
2.1. Elección de las superficies a evaluar y el método de muestreo.....	75
2.2. Estudio global de la contaminación microbiológica de los distintos puntos de muestreo.....	77
2.2.1. Zonas con mayor grado de contaminación.....	80
2.2.2. Zonas con menor grado de contaminación.....	82
2.2.3. Agentes microbianos mayormente implicados.....	84
2.3. Evolución mensual de los recuentos microbianos.....	86
2.4. Franja de seguridad establecida en base al recuento de aerobios mesófilos.....	96
2.5. Elección de los puntos de muestreo representativos dentro de los clústeres.....	99
<b>V. Desarrollo de un modelo <i>in vitro</i> para la formación de biofilms maduros por <i>Listeria monocytogenes</i> en superficies de contacto con alimentos.....</b>	<b>103</b>
1. Materiales y métodos.....	105
1.1. Superficies de estudio.....	105
1.2. Cepas bacterianas.....	105

1.3. Preparación del inóculo .....	106
1.4. Desarrollo del modelo de formación de biofilms <i>in vitro</i> .....	106
1.5. Evaluación de la formación de biofilms mediante DEM .....	107
1.6. Evaluación de la matriz del biofilm producida, durante los diferentes periodos de incubación.....	108
1.7. Estudio de la morfología y topografía de biofilms.....	109
1.8. Efecto de un recubrimiento proteico en superficies sobre la formación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> .....	110
1.9. Análisis estadístico .....	112
2. Resultados y discusión .....	113
2.1. Elección de TSYEB <sub>gluc1%+NaCl2%</sub> como medio de cultivo para la formación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> .....	113
2.2. Formación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> sobre superficies de acero inoxidable .....	113
2.3. Formación de biofilms de <i>L. innocua</i> vs <i>L. monocytogenes</i> .....	121
2.4. Producción de ECM durante los distintos periodos de incubación .....	123
2.5. Análisis morfológico y topográfico de los biofilms producidos por <i>L. monocytogenes</i> .....	126
2.6. Efecto de una capa de recubrimiento proteico en superficies sobre la formación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> .....	130
<b>VI. Detección y cuantificación de biofilms maduros de <i>Listeria monocytogenes</i>. Una comparación de diferentes métodos.....</b>	<b>133</b>
1. Materiales y métodos.....	135
1.1. Superficies de estudio.....	135
1.2. Cepas bacterianas .....	135
1.3. Preparación del inóculo y formación de biofilms en discos de acero inoxidable .....	136
1.4. Cuantificación de biofilms por DEM .....	137
1.5. Cuantificación de biofilms mediante cultivo convencional, TEMPO, VIDAS y qPCR .....	138
1.6. Detección de biofilms producidos por las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	139

1.7. Cuantificación de las células presentes en biofilms de <i>L. monocytogenes</i> formados en poliestireno mediante una curva de correlación entre OD <sub>595</sub> y UFC ml <sup>-1</sup> .....	140
1.8. Análisis estadístico.....	141
2. Resultados y discusión.....	142
2.1. Comparación de diferentes métodos para la cuantificación de células que conforman biofilms maduros de <i>L. monocytogenes</i> .....	142
2.2. Comparación de recuentos de células viables y totales de biofilm entre cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	152
2.3. Detección visual de biofilms mediante un biodetector de actividad microbiana.....	155
2.4. Cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en poliestireno mediante el ensayo de cristal violeta y la curva de correlación desarrollada.....	157
<b>VII. Eliminación de biofilms formados sobre acero inoxidable por cepas salvajes de <i>Listeria monocytogenes</i>, aisladas de la planta de procesamiento de cerdo ibérico.....</b>	<b>161</b>
1. Materiales y métodos.....	163
1.1. Superficies de estudio.....	163
1.2. Cepas bacterianas.....	163
1.3. Preparación del inóculo y formación de biofilms en discos de acero inoxidable.....	164
1.4. Agentes limpiadores.....	164
1.5. Evaluación de los ciclos de tratamiento enzimático.....	165
1.6. Procedimiento de limpieza final. Comparativa entre el tratamiento enzimático y el tratamiento con alcalinos clorados.....	166
1.7. Cuantificación de biofilms por sistema TEMPO.....	167
1.8. Análisis estadístico.....	167
2. Discusión y resultados.....	168
2.1. Establecimiento de ciclos de lavado para optimizar la acción enzimática.....	168
2.2. Comparación entre el tratamiento enzimático y con alcalinos clorados en la disgregación de biofilms maduros por cepas salvajes de <i>L. monocytogenes</i> .....	169
2.3. Soluciones de lavado y efecto desinfectante.....	175

<b>VIII. Discusión integradora .....</b>	<b>177</b>
<b>IX. Conclusiones .....</b>	<b>183</b>
<b>X. Bibliografía.....</b>	<b>189</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>217</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Implicación de las superficies de trabajo como causantes de contaminación cruzada y transmisión de ETAs .....	<b>19</b>
<b>Tabla 2.</b> Estudios sobre la transferencia de <i>L. monocytogenes</i> desde superficies de contacto con alimentos a productos alimenticios.....	<b>27</b>
<b>Tabla 3.</b> Componentes estructurales de la matriz extracelular de <i>L. monocytogenes</i> caracterizados hasta el momento.....	<b>39</b>
<b>Tabla 4.</b> Moléculas de señalización que se encuentran con mayor frecuencia en el <i>quorum sensing</i> bacteriano y fúngico .....	<b>43</b>
<b>Tabla 5.</b> Superficies de trabajo donde se instalaron los sensores SCH .....	<b>69</b>
<b>Tabla 6.</b> Media global de los recuentos obtenidos en las distintas áreas donde se instalaron los sensores SCH.....	<b>78</b>
<b>Tabla 7.</b> Períodos de incubación empleados para la formación de biofilms de <i>L. innocua</i> CECT 910 y <i>L. monocytogenes</i> CECT 935 en superficies de acero inoxidable.....	<b>107</b>
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de acero inoxidable con diferentes tiempos de incubación .....	<b>117</b>
<b>Tabla 9.</b> Recuentos y porcentaje de supervivencia obtenidos en los diferentes períodos de incubación para la formación de biofilms maduros de <i>L. innocua</i> .....	<b>122</b>
<b>Tabla 10.</b> Cepas de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas en este estudio.....	<b>136</b>
<b>Tabla 11.</b> Recuento de células que conforman biofilm maduros de <i>L. monocytogenes</i> (log (CFU cm <sup>-2</sup> )) mediante cinco métodos de cuantificación (DEM, recuento en placa, TEMPO, VIDAS y qPCR) .....	<b>143</b>
<b>Tabla 12.</b> Límites de cuantificación aproximados para las diferentes técnicas de recuento empleadas .....	<b>149</b>
<b>Tabla 13.</b> Comparación de la producción de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> entre los cuatro serotipos empleados en el estudio .....	<b>154</b>

**Tabla 14.** Porcentaje de disgregación de biofilms maduros de tres cepas de *L. monocytogenes*, obtenidos después de la aplicación distintos tratamientos de limpieza .....**173**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema del plan de trabajo seguido a lo largo del estudio .....	<b>10</b>
<b>Figura 2.</b>	Interrelación entre el abastecimiento de los alimentos (“ <i>Food Security</i> ”) y la inocuidad de los alimentos (“ <i>Food Safety</i> ”) .....	<b>14</b>
<b>Figura 3.</b>	Imagen de microscopía electrónica de barrido de <i>L. monocytogenes</i> en una superficie de acero inoxidable dañada.....	<b>21</b>
<b>Figura 4.</b>	Interacción entre una superficie sólida y el agua en función de la hidrofobicidad del material y los diferentes parámetros relacionados .....	<b>22</b>
<b>Figura 5.</b>	Representación de las etapas de formación de biofilms compuestos por múltiples especies .....	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b>	Difusión incompleta de una sustancia biocida en el interior de un biofilm maduro .....	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b>	Transmisión de señales de <i>quorum sensing</i> entre agregados celulares de <i>L. monocytogenes</i> .....	<b>42</b>
<b>Figura 8.</b>	Resumen general de algunos de los métodos utilizados para el muestreo, detección y cuantificación de la carga microbiana en superficies de contacto con alimentos .....	<b>47</b>
<b>Figura 9.</b>	Clasificación de las enzimas relevantes para el control de biofilms en formulaciones de detergentes .....	<b>61</b>
<b>Figura 10.</b>	Diagrama de las principales etapas de procesado de una de las plantas de industriales bajo estudio .....	<b>68</b>
<b>Figura 11.</b>	Diseño de un sensor SCH. ....	<b>70</b>
<b>Figura 12.</b>	Colocación de los sensores SCH con sus respectivos cupones de acero inoxidable en diferentes superficies de la planta B .....	<b>70</b>
<b>Figura 13.</b>	Recombinación entre las diferentes áreas de muestreo y su posterior asignación en clústeres por similitud basadas en el nivel total de contaminación por punto .....	<b>80</b>
<b>Figura 14.</b>	Comparación entre el porcentaje de contaminación microbiológica total que representan los puntos con mayor contaminación por año de estudio .....	<b>81</b>
<b>Figura 15.</b>	Gráfico circular del porcentaje de contaminación microbiológica total que representan entre ellas las zonas consideradas de menor contaminación ..	<b>83</b>
<b>Figura 16.</b>	Porcentaje medio de contribución a la contaminación microbiológica por los diferentes grupos microbianos a lo largo de todo el estudio .....	<b>85</b>

<b>Figura 17.</b>	Evolución mensual de los recuentos microbianos obtenidos en los 13 puntos de muestreo establecidos en la industria cárnica bajo estudio .....	<b>91</b>
<b>Figura 18.</b>	Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> identificados en las superficies.....	<b>95</b>
<b>Figura 19.</b>	Establecimiento de una franja de seguridad en base al recuento de microorganismos aerobios como posible marcador a la presencia de <i>L. monocytogenes</i> en superficies industriales.....	<b>98</b>
<b>Figura 20.</b>	Correlación entre el recuento obtenido de aerobios totales y, mohos y levaduras, en dos de los puntos donde el perfil de crecimiento entre los dos grupos microbianos es similar.....	<b>99</b>
<b>Figura 21.</b>	Evolución mensual de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos en agrupados por subgrupos dentro del clúster de superficies con menor grado de contaminación. ....	<b>100</b>
<b>Figura 22.</b>	Boxplot de los recuentos obtenidos en los diferentes períodos de incubación para la formación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> .....	<b>114</b>
<b>Figura 23.</b>	Imágenes obtenidas por DEM de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> CECT 935 teñidos con Live/Dead y formados después de las diferentes condiciones de incubación .....	<b>119</b>
<b>Figura 24.</b>	Imágenes obtenidas por DEM de biofilms de <i>L. innocua</i> CECT 910 teñidos con Live/Dead y formados después de las diferentes condiciones de incubación .....	<b>123</b>
<b>Figura 25.</b>	Imágenes obtenidas por DEM de la matriz de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> CECT 935 teñidos con SYPRO Ruby Biofilm Matrix Stain y formados después de las diferentes condiciones de incubación.....	<b>124</b>
<b>Figura 26.</b>	Imágenes obtenidas por DEM tras la evaluación de la matriz extracelular de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> con distintos tintes fluorescentes.....	<b>126</b>
<b>Figura 27.</b>	Representación 3D del modelo de formación de biofilms realizado para <i>L. monocytogenes</i> .....	<b>127</b>
<b>Figura 28.</b>	Imágenes obtenidas por SEM de biofilms formados por <i>L. monocytogenes</i> CECT 935.....	<b>129</b>
<b>Figura 29.</b>	Recuento Log (UFC cm <sup>-2</sup> ) obtenido a partir de los valores OD <sub>595</sub> de cinco cepas diferentes de <i>L. monocytogenes</i> (Lm) incubadas una semana (48 h + 24 h + 24 h + 72 h) estáticamente a 30°C en (■) poliestireno, (▨) poliestireno con una capa proteica acondicionadora.....	<b>130</b>

<b>Figura 30.</b>	Correlación entre el recuento de <i>L. monocytogenes</i> (log (UFC ml <sup>-1</sup> )) y RFU obtenidas mediante el análisis por VIDAS. ....	<b>145</b>
<b>Figura 31.</b>	Imágenes obtenidas mediante DEM de biofilms maduros de distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> teñidos con Life/Dead formados, clasificadas de menor a mayor capacidad de producción de biofilms.....	<b>147</b>
<b>Figura 32.</b>	Correlación entre, por una parte TEMPO y recuento en placa, y por la otra, DEM y qPCR de los recuentos (log (UFC cm <sup>-2</sup> )) obtenidos a partir de la cuantificación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> .....	<b>150</b>
<b>Figura 33.</b>	Recuentos (log (UFC cm <sup>-2</sup> )) de células totales, representadas en barra, y células viables, representadas en línea, tras el análisis de imágenes obtenidas mediante DEM de biofilms producidos por diferentes cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	<b>152</b>
<b>Figura 34.</b>	Reacciones después de la aplicación de BioFinder para la detección de biofilms de diferentes cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	<b>156</b>
<b>Figura 35.</b>	Correlación entre el recuento de <i>L. monocytogenes</i> (UFC ml <sup>-1</sup> ) y la medida de absorbancia a OD <sub>595</sub> obtenida mediante el análisis por cristal violeta.....	<b>157</b>
<b>Figura 36.</b>	Recuentos microbianos (UFC cm <sup>-2</sup> ) obtenidos a partir de la cuantificación de la biomasa adherida de diferentes cepas de <i>L. monocytogenes</i> mediante el ensayo de cristal violeta .....	<b>158</b>
<b>Figura 37.</b>	Recuentos microbianos (UFC cm <sup>-2</sup> ) obtenidos a partir de la cuantificación de células de <i>L. monocytogenes</i> CECT 935 despegadas del biofilm formado sobre discos de acero inoxidable después de distintos tratamientos enzimáticos a diferentes ciclos.....	<b>168</b>
<b>Figura 38.</b>	Recuentos microbianos (log UFC cm <sup>-2</sup> ) obtenidos a partir de la cuantificación de biofilms maduros, de las tres cepas de <i>L. monocytogenes</i> y de las células de <i>L. monocytogenes</i> remanentes en la superficie, después de los tratamientos aplicados.....	<b>171</b>
<b>Figura 39.</b>	Recuentos microbianos (log UFC cm <sup>-2</sup> ) obtenidos en las soluciones enzimáticas de lavado en el transcurso de los diferentes ciclos de tratamiento.....	<b>175</b>



## **I. Introducción**



La capacidad de las bacterias para adherirse a las superficies industriales y posteriormente desencadenar la formación de biofilms, tiene implicaciones significativas para la industria alimentaria, en especial por sus consecuencias, tanto a nivel de salud pública como económicas (Vogeleer *et al.* 2014; Khelissa *et al.* 2017). Los biofilms se describen como agregaciones microbianas que crecen en superficies excretando diferentes sustancias, como polisacáridos, proteínas o ADN extracelular, entre otras, que se incluyen en una matriz extracelular (Donlan, 2002; Donlan & Costerton, 2002). Estas estructuras permiten que los patógenos permanezcan en la industria alimentaria durante largos períodos de tiempo, lo que posibilita que algunas cepas se adapten a entornos hostiles y desarrollen diferentes mecanismos de resistencia, aumentando de esta manera las posibilidades de contaminación cruzada de los alimentos (Fox *et al.* 2011). La matriz generada confiere protección a los microorganismos contra factores ambientales tales como agentes antimicrobianos, desecación, rayos UV, salinidad y tratamientos con agentes desinfectantes, es por esta razón que son particularmente difíciles de erradicar (Speranza *et al.* 2016).

Un microorganismo que presenta un riesgo relevante para la salud pública, debido a su alta tasa de mortalidad entre la población de riesgo, como personas con sistemas inmunológicos vulnerables, ancianos y su relación con abortos, es *Listeria monocytogenes* (Mateus *et al.* 2013). Este patógeno es capaz de adherirse, colonizar y formar biofilms en diferentes superficies empleadas en la industria alimentaria, persistiendo durante años en las mismas, y causando contaminación cruzada entre las superficies y los productos alimenticios (Colagiorgi *et al.* 2017). Éste es uno de los factores asociados a los brotes de toxiinfección alimentaria.

Un punto importante para la prevención de la contaminación microbiológica de los alimentos sería mantener altos estándares de higiene en el ambiente de procesado de alimentos, especialmente en áreas tales como superficies, equipos e instalaciones (Osimani *et al.* 2014). Por esta razón, los procedimientos de limpieza y desinfección son una parte importante de los prerrequisitos dentro del sistema APPCC. Manteniendo este sistema actualizado, junto a la evaluación continua de la presencia de biofilms en las plantas procesadoras de alimentos, se podría ayudar a proporcionar una información más clara sobre la contaminación microbiológica, así como también ayudaría en el desarrollo de sistemas de procesado libres de biofilms. En este sentido, la vigilancia y el control de

los procedimientos de limpieza y desinfección, mediante técnicas tradicionales y/o rápidas, es la única vía para la verificación de la eficacia de los mismos, así como para asegurar las condiciones higiénico sanitarias adecuadas para el procesado y manipulación de los alimentos (Bloomfield *et al.* 2017).

El desarrollo de sistemas experimentales, que simulen de forma efectiva las condiciones del entorno de procesado de alimentos, ciertamente puede suponer una gran contribución al estudio de la formación de biofilms, tanto de *L. monocytogenes* como de muchos otros patógenos transmitidos por los alimentos (Colagiorgi *et al.* 2017). Por esta razón, el estudio de biofilms en su etapa madura es completamente crucial para comprender cómo reproducirlos y eliminarlos, no solo *in vitro*, sino también en condiciones reales. En general, su estudio se ha centrado en modelos simples con cortos periodos de incubación, lo que no llega a representar cómo se encuentran en la industria. La búsqueda de metodologías para su control y erradicación se considera una necesidad real para la industria alimentaria.

## **II. Objetivos y plan de trabajo**



Los objetivos generales de la presente tesis doctoral fueron:

- La evaluación de la contaminación microbiológica de superficies de la industria alimentaria, con un especial abordaje a la detección de *Listeria monocytogenes*.
- La formación, detección, cuantificación y eliminación de biofilms maduros de *Listeria monocytogenes*.

Los objetivos específicos del primer objetivo general fueron:

- a) Detectar puntos con alta contaminación microbiana, a escala industrial, mediante el empleo de detectores de actividad microbiana.
- b) Comparación con los resultados habituales de los controles de superficie de la empresa bajo estudio.
- c) Instalar los sensores SCH para el muestreo continuo de las superficies de la industria alimentaria.
- d) Realizar un estudio ecológico de la contaminación microbiana en las superficies mediante recuento tradicional en placa y TEMPO.
- e) Aislamiento, identificación y serotipado de los aislamientos sospechosos de *L. monocytogenes*.

Para alcanzar estos objetivos específicos, se estudiaron las superficies de la empresa colaboradora y se planteó el siguiente estudio experimental:

1. *Evaluación de la contaminación microbiológica de superficies mediante la implementación de sensores SCH en una planta de procesado de cerdo ibérico.*

Los objetivos específicos del segundo objetivo general fueron:

- a) Evaluar el tiempo necesario para la formación de biofilms, por parte de *L. monocytogenes* y *L. innocua*, en condiciones estáticas y con renovación de medio de cultivo.
- b) Valorar la influencia de residuos proteicos sobre superficies, en la formación de biofilms por *L. monocytogenes*.
- c) Desarrollar un modelo de formación de biofilms por *L. monocytogenes* para emplearlo como estándar.
- d) Comparar la capacidad para formar biofilms por parte de distintas cepas de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable y poliestireno.
- e) Comparación entre las técnicas de recuento de DEM, recuento en placa, TEMPO, VIDAS, qPCR, y cristal violeta para la cuantificación de biofilms de *L. monocytogenes*.
- f) Puesta a punto y elaboración de curvas patrón obtenidas, a partir de los resultados de VIDAS, qPCR y cristal violeta, para la cuantificación microbiana.
- g) Emplear un biodetector de actividad microbiana, para la detección de biofilms de *L. monocytogenes*.
- h) Comparar la eficacia de un producto enzimático con un detergente alcalino clorado, para la eliminación de biofilms de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable.

Para alcanzar estos objetivos específicos, se plantearon tres estudios experimentales:

1. *Desarrollo de un modelo in vitro para la formación de biofilms maduros por Listeria monocytogenes en superficies de contacto con alimentos.*

2. *Detección y cuantificación de biofilms maduros de Listeria monocytogenes. Una comparación de diferentes métodos.*
  
3. *Eliminación de biofilms formados sobre acero inoxidable, por cepas salvajes de Listeria monocytogenes, aisladas de la planta de procesamiento de cerdo ibérico.*

En la **Figura 1** se muestra el plan de trabajo planteado para este proyecto de investigación.

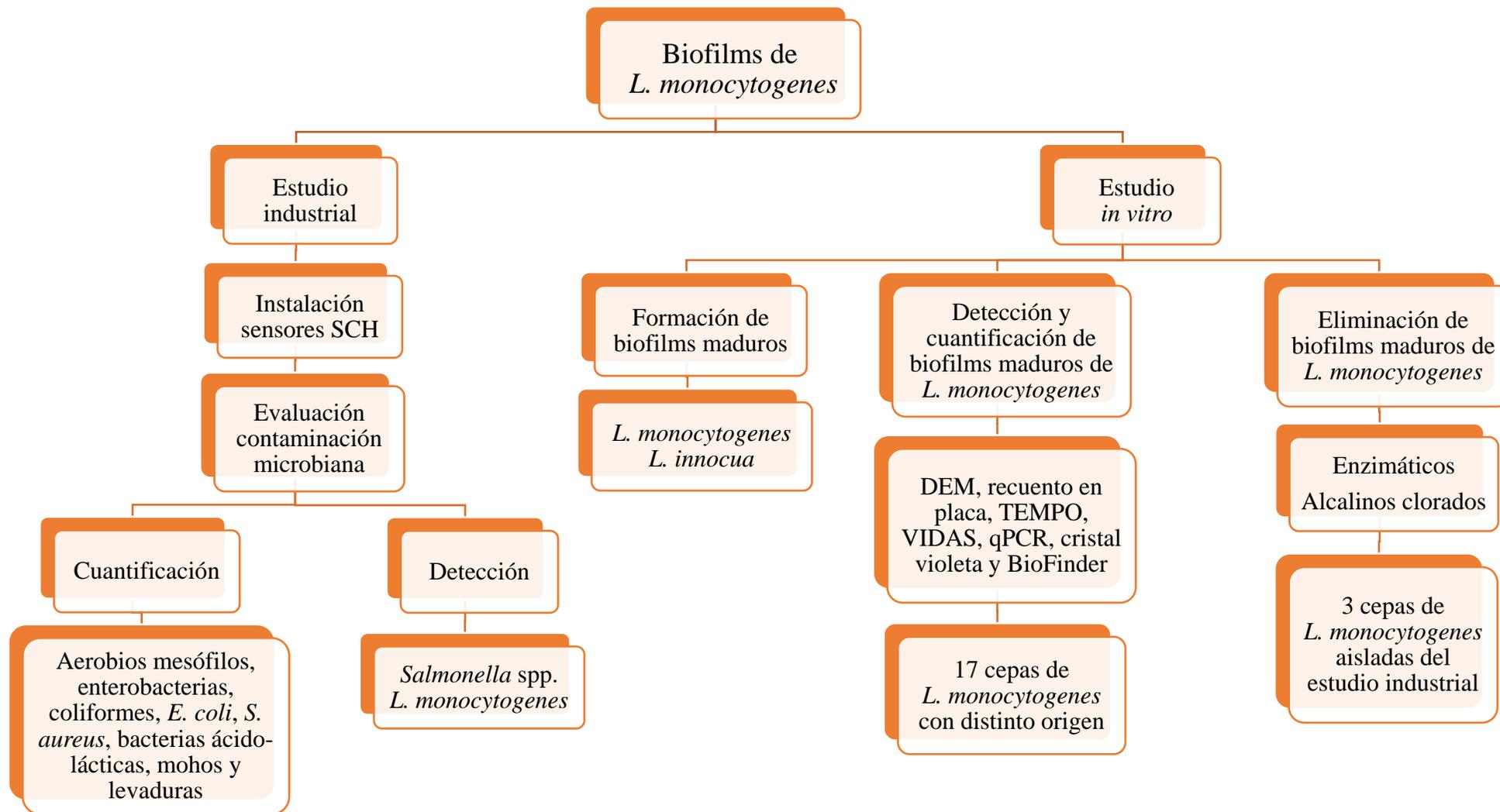


Figura 1. Esquema del plan de trabajo seguido a lo largo del estudio.

### **III. Revisión bibliográfica**

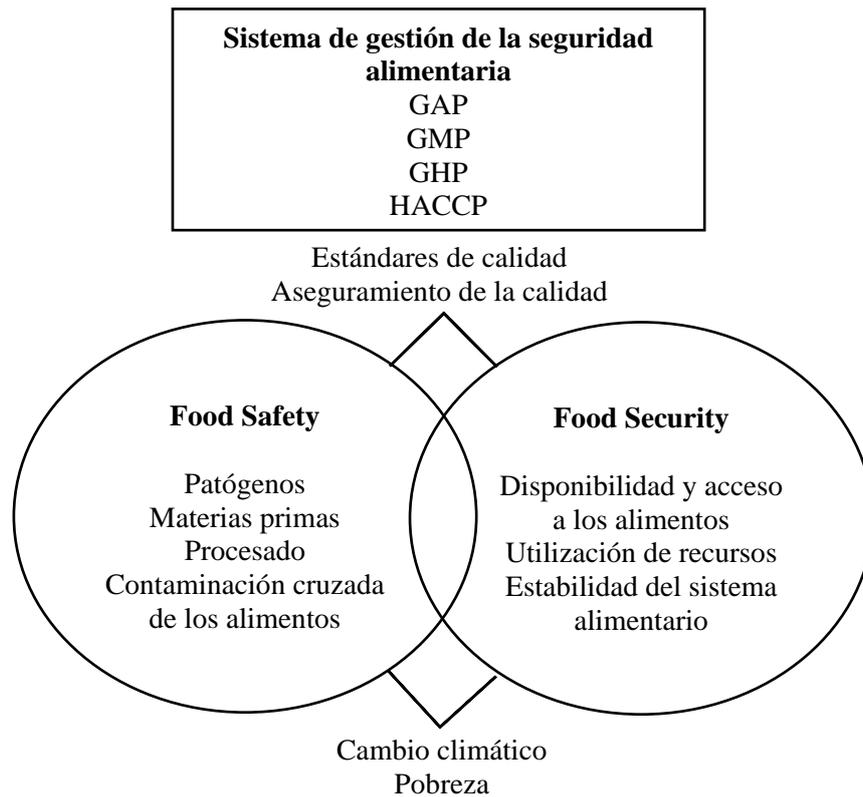


## 1. Importancia de la seguridad alimentaria

A día de hoy, se estima que la población mundial llegará a alcanzar los 9.800 millones en 2050, lo que a su vez irá acompañado de un aumento significativo de la demanda de alimentos a nivel mundial (FAO, 2009; UN, 2017). Para satisfacer tal demanda se han presentado una serie de sugerencias, con el objetivo de duplicar la producción, cerrando la brecha existente entre la población subalimentada y sobrealimentada. Entre ellas destaca el aumento del rendimiento de las tierras cultivables, lo que puede aumentar, no sólo en la extensión de las mismas, sino también en la extensión de la acuicultura y los límites de producción. Por ello, y en paralelo, se puede reducir el desperdicio de alimentos y reorientar las recomendaciones en materia de nutrición (Godfray *et al.* 2010). Llegar a implementar estas propuestas justamente en este momento, donde claramente el cambio climático es un problema (Lobell *et al.* 2008), donde hay un constante agotamiento de los recursos naturales (Neset y Cordell 2012) y una posible conversión de tierras agrícolas a la producción de biocombustibles (Vasile *et al.* 2016), resulta una tarea altamente desafiante. Sin embargo, no llegar a suplir la demanda podría tener consecuencias directas en la seguridad alimentaria, en términos de abastecimiento de alimentos a nivel mundial. Se entiende que, para tener una vida activa y saludable, los alimentos no sólo deben estar disponibles, ser de fácil acceso y nutritivos, además deben ser inocuos para el consumidor, lo que muestra una interrelación entre la seguridad alimentaria en términos de abastecimiento (“*Food Security*”) e inocuidad (“*Food Safety*”) ilustrados en la **Figura 2**. Garantizar la inocuidad de los alimentos contribuirá al abastecimiento de éstos. Cumplir con el abastecimiento de los alimentos, indicará que las medidas para la inocuidad se implementan y controlan a lo largo de la cadena de producción de los alimentos.

La inocuidad de los alimentos es uno de los problemas más importantes en relación a su producción industrial debido, en gran medida, al riesgo de transmisión de enfermedades de origen alimentario (Renzo *et al.* 2015). De hecho, según la OMS, estas enfermedades han sido uno de los problemas de salud pública más extendido en el mundo contemporáneo y una causa importante de reducción de la productividad económica (WHO 1992). Es por esta razón que los gobiernos, por una parte, y los integrantes de la cadena alimentaria por otra, están intensificando sus esfuerzos para adaptar y controlar la gran variedad de peligros existentes; para asegurar que la inocuidad y la calidad de los

alimentos no se vean comprometidas. Entre los factores que afectan directamente a la inocuidad de los alimentos y que están en constante cambio, se pueden encontrar agentes patógenos emergentes, que causan enfermedades de transmisión alimentaria, así como también cambios asociados al estilo de vida, hábitos alimenticios, edad de la población o nivel socio-económico (Hussain y Dawson, 2013).



**Figura 2.** Interrelación entre el abastecimiento de los alimentos (“*Food Security*”) y la inocuidad de los alimentos (“*Food Safety*”).

La globalización ha conllevado a un movimiento internacional de productos alimenticios, aumentando consecuentemente el comercio internacional y, a su vez, los riesgos para la salud (Unnevehr y Roberts, 2002). Por ello, ante un brote ocasionado por alguna enfermedad de transmisión alimentaria, éste se puede diseminar con facilidad y, si no se tiene un sistema de vigilancia apropiado para su control, el número de afectados puede ser significativamente mayor. Esto genera situaciones de crisis, lo que implica una reducción en el consumo de alimentos y la aparición de crisis económicas, lo que afecta a amplios sectores productivos.

## 2. Enfermedades transmitidas por los alimentos. Incidencia e impacto.

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) pueden ser definidas como un amplio grupo de patologías, originadas por la ingesta de agua o alimentos contaminados por microorganismos patógenos, contaminantes químicos y biotoxinas; además de las reacciones individuales del cuerpo humano a los microorganismos (WHO 2006).

La aparición de un brote ocurre cuando dos o más personas padecen unos síntomas parecidos, tras ingerir un mismo producto alimenticio. La contaminación de los alimentos se puede originar en cualquier punto, en el transcurso de tiempo que va, desde la elaboración, hasta el consumo del alimento. Ésta puede comportar la aparición de ETAs responsables de una gran variedad de síntomas de distinta gravedad, tales como diarreas, vómitos, otras complicaciones gastrointestinales e incluso problemas inmunológicos, fallos multiorgánicos o la muerte (WHO 2015). Por esta razón, un control eficaz de higiene es de gran importancia para evitar estas consecuencias adversas para la salud (Codex Alimentarius 2003).

Las ETAs no sólo afectan a la salud y bienestar de las personas, sino que conllevan consecuencias a nivel económico para los países, ya que reducen notablemente la productividad económica, imponiendo una considerable carga a los sistemas públicos de atención a la salud (Roberts 2000). La incidencia real y el impacto económico y social de las distintas ETAs es muy complicado de evaluar con precisión. De todas formas, se han realizado diferentes estudios para poder evaluar y cuantificar, de manera aproximada, la incidencia de este tipo de enfermedades. Es así como Mead *et al.* (1999), en una evaluación específica, estimaron que en los Estados Unidos se producían, sobre una población de 267,7 millones de habitantes, un total de 76 millones de casos anuales de ETAs, con 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes. Con estos datos se reveló que alrededor del 30 % de la población padecía alguna enfermedad de origen alimentario, con una tasa de mortalidad próxima a dos muertes por cada 100.000 habitantes. Una década después, Scallan *et al.* (2011) llevaron a cabo otro estudio, donde se observó que estas cifras se podían rebajar ligeramente. Según esta evaluación, en Estados Unidos habría 9,4 millones de casos producidos por ETAs, pero que, a su vez, esta cifra se vería incrementada hasta los 47,78 millones si se engloban también otros agentes causales, como por ejemplo peligros de origen químico o físico. Esto supondría 127.839 personas

hospitalizadas y 3.037 muertes. Estas diferencias entre las estimaciones realizadas en las evaluaciones y, por tanto, la falta de exactitud en cuanto a las incidencias reales, se entienden al saber que un alto porcentaje de los ETAs no se señalan, registran o diagnostican por las autoridades sanitarias. Esto implica que, al final, el porcentaje de casos registrados por las autoridades sanitarias sea muy pequeño en relación a la incidencia real entre la población (Arendt *et al.* 2013).

Dentro de Europa, los sistemas de registro nacionales, los métodos de diagnóstico y las notificaciones oficiales varían notablemente entre países. No obstante, indican la misma tendencia que en Estados Unidos, es decir, que la incidencia real de las ETAs es superior a la declarada. En el último informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) junto con el Centro Europeo de Control de Enfermedades (European Center of Disease Control, ECDC), se revisaron las tendencias y fuentes de zoonosis y agentes zoonóticos en personas, animales, alimentos y piensos a nivel europeo. En éste se incluyó información sobre brotes de enfermedades alimentarias. Los datos reflejan que en el año 2016 se documentaron un total de 360.524 casos de ETAs en la Unión Europea, de los cuales 34.442 fueron hospitalizados, y 485 murieron (EFSA-ECDC 2017). Por tanto, sobre una población de 500.000.000 personas en la UE, se produce un caso de ETA al año por cada 1.400 habitantes, de los que 1 de cada 14.500 son hospitalizados y 1 de cada millón llega a morir. Cifras bajas, pero no despreciables. En este mismo informe se indica que los agentes principalmente implicados en estas ETAs son *Campylobacter* y *Salmonella*; suponiendo un 68,32 % y un 26,22 % del total de los casos documentados, respectivamente. Aunque estos dos patógenos son los que más porcentaje de ETAs producen, tienden a decrecer. En el caso de la campylobacteriosis, la tendencia creciente de la UE para casos humanos confirmados desde 2008 se estabilizó durante 2012-2016, aunque en 2016 disminuye ligeramente respecto al año anterior. En el caso de la salmonelosis, su tendencia es claramente decreciente desde 2008, describiéndose menos casos cada año. Algo diferente ocurre con la listeriosis, patología producida por *Listeria monocytogenes*, que es la única ETA que muestra una notable tendencia creciente en la UE durante los últimos 5 años (2012-2016), con un aumento del 9,3 % de los casos confirmados de 2015 a 2016. Del total de ETAs descritos, 2.536 casos fueron provocados por este patógeno, teniendo una incidencia de 0,70 % y la tasa de mortalidad más elevada (16,2 %) respecto al resto de patógenos durante el transcurso de estos 5 años. Esto supone que sólo este microorganismo sería

responsable de 410 muertes en el transcurso de este periodo, o lo que es lo mismo, el 85 % de la totalidad de muertes por ETA en la UE. Aunque parece que el número de casos tiene un bajo porcentaje en comparación con otros patógenos, su alta tasa de mortalidad entre personas con sistemas inmunológicos vulnerables y ancianos, y su conexión con malformaciones fetales y abortos, lo convierte en un problema de salud pública muy considerable (Farber y Peterkin 1991). Por tanto, el control de este microorganismo a lo largo de la cadena alimentaria supondría una reducción de la mortalidad en Europa de 82 personas al año, por enfermedades de transmisión alimentaria.

Los alimentos pueden ser fácilmente contaminados a lo largo de la cadena de producción, debido a la mala manipulación o a un procesamiento inadecuado. Por este motivo, la implantación de procedimientos como el sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC), las buenas prácticas de higiene y las buenas prácticas de fabricación, son un requisito legal de gran importancia, justamente para evitar la aparición de estos brotes epidemiológicos (Panisello *et al.* 2000). La tecnología actual permite la mejora de la calidad microbiológica de muchos productos, pero no garantiza en muchos casos la ausencia completa de patógenos (Álvarez-Gurrea 2015)

Según las estadísticas publicadas por el Centro Nacional de Epidemiología, los principales alimentos implicados en los brotes de ETAs durante el periodo del 2008 al 2011 en España fueron huevos, ovoproductos y mayonesa, suponiendo el 24,6 % del total, seguido de la carne y productos cárnicos (8 %), marisco (7,4 %) y pescado y productos de la pesca (6,5 %) (Espinosa *et al.* 2014). La gran variedad de productos alimenticios existentes en el mercado, su complejidad y su progresiva industrialización, han supuesto que la epidemiología de las ETAs cambie radicalmente. Muchos alimentos son elaborados con diferentes materias de origen animal, complicando enormemente el control de la seguridad de los mismos. Cabe destacar también que el 31 % de los brotes tiene un origen desconocido, asociado a entornos de restauración colectiva o domésticos, en los que es complejo acabar relacionando al agente causante de la ETA con el alimento. Finalmente, es importante desatacar que existen diferentes factores contribuyentes, que desencadenan los brotes de transmisión alimentaria, siendo el mayoritario la contaminación cruzada, que representa el 26,5 % respecto del total, indicando a su vez la gran relevancia que posee.

### 3. Implicación de la contaminación cruzada en las ETAs

La contaminación cruzada durante el procesado de alimentos se ha identificado como un factor importante asociado con las ETAs (Wanyenya *et al.* 2004). Este concepto se define como la contaminación directa o indirecta, por parte de microorganismos, de una matriz no contaminada a partir de una matriz que sí lo está, ya sean alimentos, superficies de trabajo u operarios, entre otros. Además, existe otro término importante, la recontaminación, el cual se relaciona con la contaminación de los alimentos después de haber sido sometidos a un tratamiento higienizante (Carrasco *et al.* 2012).

Hoy en día, se ha llegado a destacar el importante papel que juega la contaminación cruzada en la transmisión de las ETAs. Aunque identificar el origen de estas enfermedades a menudo resulta complicado; por la falta de datos precisos aportados por los gobiernos, industrias, así como también investigaciones incompletas, es importante poner esfuerzos para poder determinarlo. De entre estos estudios destaca uno realizado por la OMS a nivel europeo en 1995, donde se estimó que el 25 % de los brotes estaban asociados a contaminaciones cruzadas. Se destacaron factores tales como las prácticas higiénicas ineficientes, superficies contaminadas y la falta de higiene de los manipuladores, que fueron determinantes para que la contaminación cruzada ocurriera (Tirado y Schmidt 2001). Laufer *et al.* (2015) realizaron una evaluación de seguimiento, en los Estados Unidos, de todos los brotes de infecciones transmitidas por *Salmonella* spp., atribuidas a la carne de vacuno, durante el periodo entre el 1973 al 2011. De entre los diferentes factores implicados cuantificaron en un 45 % a la contaminación cruzada, como origen de los brotes analizados. En otro estudio más reciente, donde se quería relacionar las características de las ETAs con la identificación de factores contribuyentes a su transmisión, se volvió a destacar la importancia de la contaminación cruzada a nivel de la industria alimentaria (Brown *et al.* 2017). Es por este motivo que, desde hace un tiempo, el control de las superficies a nivel de contaminación microbiológica es de gran interés, puesto que éstas, ya sean superficies de contacto con alimentos, equipos y/o utensilios, han sido las causantes de la transmisión de patógenos, al entrar en contacto con el alimento, cuando previamente han estado contaminadas (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Implicación de las superficies de trabajo como causantes de contaminación cruzada y transmisión de ETAs. Adaptado de Rocourt *et al.* (2003) y Reij y Den Aantrekker (2004).

Patógeno asociado	Alimento implicado	Vía de contaminación	Referencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	Mantequilla	Medio ambiente de proceso	Lyytikäinen <i>et al.</i> (2000)
	Carne cocida	Máquina de corte	Lundén <i>et al.</i> (2002)
	Paté	Máquina de envasado	Goulet <i>et al.</i> , (1998)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Yogur aromatizado	Bomba utilizada anteriormente para leche sin pasteurizar	Morgan <i>et al.</i> (1993)
	Hamburguesas	Prácticas incorrectas de higiene	Mead <i>et al.</i> (1997)
<i>Salmonella enterica</i>	Helado	Cisterna para transportar crema de helado empleado anteriormente para huevo crudo	Hennessy <i>et al.</i> (1996)
<i>Salmonella enterica</i> var Typhymurium	Lonchas de jamón cocido	Recipientes utilizados anteriormente para el curado de la carne de cerdo cruda	Llewellyn <i>et al.</i> (1998)
<i>Salmonella enterica</i> var Ealing	Fórmula infantil	Línea de procesado	Cahill <i>et al.</i> (2008)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Batido de chocolate	Contaminación post-proceso procedente del medio ambiente	Black <i>et al.</i> (1978)
<i>Bacillus cereus</i>	Leche pasteurizada	Máquina de llenado	Eneroth <i>et al.</i> (2001)

Asimismo, varios autores han observado que la contaminación cruzada de patógenos bacterianos y virales en los hogares y en los establecimientos de restauración colectiva, podría ser el principal factor contribuyente a las enfermedades transmitidas por alimentos esporádicas o epidémicas (Bloomfield 2003; Chen *et al.* 2001). Las superficies pueden llegar a ser un reservorio muy importante de microorganismos, que pueden llegar a través de diferentes vías. Una de ellas es a través de los manipuladores de alimentos, que en sus manos pueden tener presentes patógenos a bajas dosis infectivas, pudiendo ser fácilmente transferibles a superficies alimentarias, donde podrían perdurar durante mucho tiempo, incluso pudiendo seguir viables después de aplicar tratamientos de limpieza y desinfección (Humphrey *et al.* 1994; Todd *et al.* 2009). Esto aumenta exponencialmente el peligro de ocasionar contaminaciones cruzadas, con el consiguiente riesgo para la salud pública (de Cesare *et al.* 2003). Además, las diferentes superficies de la industria alimentaria pueden actuar, también, como reservorio de microorganismos alterantes (Bagge-Ravn *et al.* 2003), que al transferirse a un producto alimenticio, pueden causar

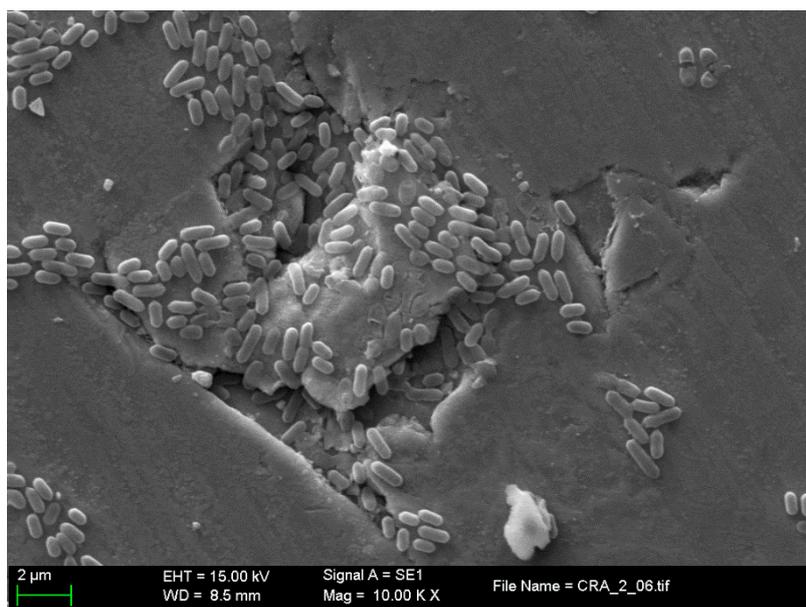
problemas de deterioro provocado por actividades enzimáticas del propio microorganismo, con la consecuente pérdida de calidad. Es importante, pues, que existan estrategias de limpieza y desinfección para lograr reducciones significativas de la carga microbiana y mejorar las condiciones de higiene. La monitorización regular de la efectividad de las prácticas de limpieza y desinfección podría servir como una medida preventiva crucial.

Tal y como se ha resaltado, la contaminación cruzada es un factor claramente importante en la transmisión de las ETAs, así como de agentes biológicos que causan el deterioro de los alimentos. Debido a su repercusión y a la importancia que tiene la microbiología predictiva en estos momentos, que pretende buscar respuestas microbianas frente a factores ambientales para poder controlarlos, se han intentado generar modelos predictivos que permitan caracterizar la variabilidad asociada a la transferencia microbiana de superficies de contacto con alimentos, a otras superficies o matrices receptoras. En los últimos años, la comprensión de la dinámica de transferencia en los modelos predictivos permite proporcionar enlaces cuantificables entre los parámetros de control de procesado y los niveles microbianos, simplificando la complejidad de estas relaciones para su implementación en modelos de evaluación del riesgo. No obstante, hoy en día tienen ciertas limitaciones debido principalmente a su falta de reproducibilidad (Possas *et al.* 2017).

#### **4. Superficies en la industria alimentaria**

Las superficies de la industria alimentaria son un punto importante de acumulación de restos de materia orgánica, aspecto completamente crítico, porque desencadena y estimula la adhesión microbiana (Whitehead *et al.* 2010). La acumulación de materia orgánica en las superficies de contacto con alimentos proporciona una buena fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos, incluidos los patógenos y alterantes, lo que puede conllevar a problemas de salud pública o pérdida de calidad de los alimentos, puesto que su presencia supone una biotransferencia potencial al alimento. Este último concepto es importante, ya que hace referencia a la capacidad de ser transferidas desde un sustrato inerte a otro tipo de sustrato, resultando en la multiplicación y contaminación de la superficie implicada (Verran 2002). Es por esta razón que la limpieza eficaz y

regular de las superficies es imprescindible. Sin embargo, hay superficies que poseen poca facilidad de limpieza, por tener defectos de dimensión o distribución, tales como perforaciones, pozos, grietas, soldaduras, articulaciones, uniones o poros, convirtiéndose en materiales más propensos a mantenerse con suciedad, incrementándose las posibilidades de retención de residuos, así como de anclaje de microorganismos, siendo así un potencial reservorio de estos últimos (**Figura 3**) (Taylor *et al.* 1998).



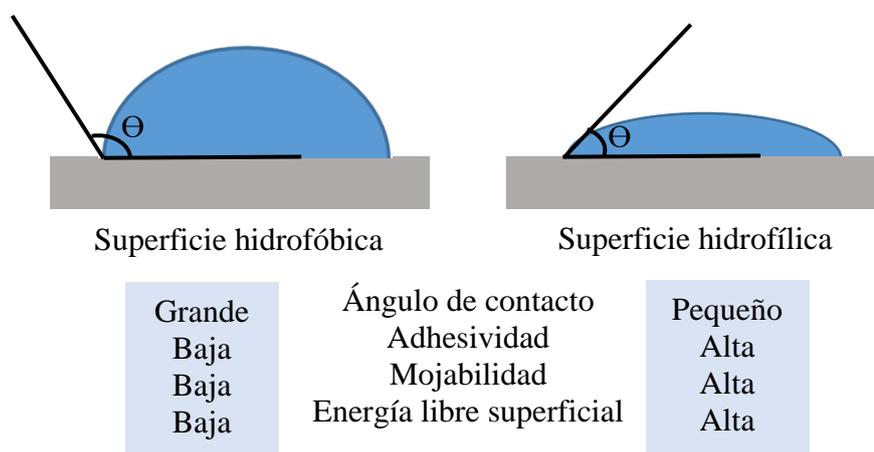
**Figura 3.** Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido de *L. monocytogenes* en una superficie de acero inoxidable dañada. Las células tienden a entrar en la grieta y de esta manera, se protegen.

#### 4.1. *Propiedades de las superficies*

Las distintas propiedades de las superficies empleadas en la industria alimentaria son importantes, ya que tienen una influencia directa en la adhesión microbiana y la posterior formación de biofilms (Garrett *et al.* 2008). Entre el conjunto de propiedades destacan la rugosidad superficial, la resistencia al desgaste, la facilidad de limpieza y desinfección, o la hidrofobicidad, que condicionan de forma directa la elección de los materiales para el diseño de las superficies. Los materiales comúnmente utilizados en la industria de los alimentos incluyen plástico, caucho, vidrio, cemento o acero inoxidable, entre otros,

siendo este último el más ampliamente utilizado para el diseño de equipos y utensilios de trabajo, por haber demostrado ser higiénico.

Una de las propiedades con mayor grado de influencia en la adhesión microbiana es la energía libre superficial, que está estrechamente ligada a la hidrofobicidad de la superficie (Busscher *et al.* 1984) y contribuye directamente a la condición higiénica de ésta (Jullien *et al.* 2002). Existe una diferencia energética entre las moléculas situadas en la superficie de un material respecto a las que se encuentran en su interior, siendo las moléculas superficiales las que poseen un estado energético superior. Debido a su estado de alta energía, las moléculas que se encuentran en la superficie interactúan con otras moléculas en la fase adyacente. Es por esta razón que el concepto de energía libre superficial está muy relacionado con la hidrofobicidad. La alta capacidad que tiene el agua para enlazarse, posibilita interactuar fácilmente con superficies que poseen una elevada energía libre superficial y, por tanto, son más hidrofílicas. De este modo, la hidrofobicidad de un material disminuye cuando aumenta la energía libre superficial (**Figura 4**) (Güleç *et al.* 2006). Por ejemplo, superficies de vidrio o acero inoxidable poseen una alta energía libre superficial y por tanto son más hidrofílicas en comparación con otras superficies que poseen baja energía superficial como el poliestireno o el teflón.



**Figura 4.** Interacción entre una superficie sólida y el agua en función de la hidrofobicidad del material y los diferentes parámetros relacionados. Modificado de Neira-Arenas y Cañas (2007).

Otro factor de las superficies de contacto con los alimentos a destacar es su preacondicionamiento, obtenido de la adsorción de iones cargados o moléculas orgánicas, cuando esta superficie entra en contacto, por ejemplo, con un medio acuoso. Como resultado, las propiedades fisicoquímicas de la superficie se modifican, demostrando que puede mejorar las propiedades de la superficie y, consecuentemente, tener un efecto directo en la adhesión microbiana (Mettler y Carpentier 1997). De este modo, la adhesión de las bacterias a las superficies ocurre más fácilmente en superficies preacondicionadas, así como también cuando la energía libre total de adhesión es negativa. Si las superficies de contacto con los alimentos tienen una carga global negativa, las células microbianas van a ser repelidas porque su carga neta de superficie celular también es negativa (Jansen y Kohlen 1995; Teixeira *et al.* 2005).

En el entorno de procesamiento de alimentos, las superficies de contacto con los alimentos pueden verse preacondicionadas por residuos procedentes de alimentos durante el procesamiento. Este acondicionamiento puede tener un efecto positivo o negativo en la adhesión celular. Por ejemplo, el caso de *L. monocytogenes* se ha observado que su anclaje a superficies puede ser favorecido si éstas han estado preacondicionadas con leche desnatada, pero sin embargo se ha visto inhibido si han tenido un preacondicionamiento con gelatina o pepsina (Hood y Zottola, 1995; Chmielewski y Frank, 2003). En otro estudio realizado por Somers y Wong (2004) se demostró que los residuos de las salchichas de pavo o ternera mejoraban la supervivencia de *L. monocytogenes* a largo plazo y se atribuía a un papel protector que ejercía la grasa.

## **5. *Listeria monocytogenes*, un patógeno emergente.**

### **5.1. *Características generales***

Desde la década de los 80, se reconoce a *L. monocytogenes* como un patógeno que puede ser transmitido a través de los alimentos, y que es causante de la enfermedad denominada listeriosis (Nightingale *et al.* 2004). *L. monocytogenes* es un organismo ubicuo, ampliamente distribuido en el medio ambiente, que puede habitar una amplia gama de nichos ecológicos, tal y como se ha demostrado en aislados de plantas, animales, suelo, ensilados, residuos de mataderos, leche procedente de animales sanos o con

mastitis, heces humanas y de animales y aguas residuales (Farber y Peterkin 1991). Este microorganismo es capaz de introducirse en la cadena alimentaria, vía materia prima, pudiendo sobrevivir en reservorios o recontaminar productos finales (Ferreira *et al.*, 2011; Holch *et al.*, 2013; Ruckerl *et al.*, 2014). Debido a su capacidad de sobrevivir a temperaturas que van desde -0,4 a 50 °C, pH 4,7 a 9,2 y altas concentraciones de azúcar (39,4 % sacarosa) y sal (10 % NaCl), se reconoce como un microorganismo con una muy buena adaptación a condiciones desfavorables respecto a otros microorganismos (Gandhi y Chikindas 2007).

La primera identificación de este patógeno fue en 1926 en un estudio liderado por Murray *et al.* (1926) quienes lo denominaron *Bacterium monocytogenes*, tras haber observado la monocitosis que provocaba en un grupo de conejos. No obstante, no fue hasta el 1940 cuando se designó al microorganismo con su nombre actual (Pirie 1940). Desde que el patógeno fue identificado se empezaron a documentar diferentes manifestaciones de infecciones, causadas por *L. monocytogenes* en animales y humanos, aunque no fue hasta 1981 cuando se relacionó, de una manera directa, y por primera vez, la enfermedad infecciosa causada por este patógeno con el consumo de alimentos. Este primer brote de listeriosis a nivel alimentario sucedió en Canadá y se asoció al consumo de ensalada de col contaminada (Schlech *et al.* 1983). Desde entonces, los brotes de listeriosis han demostrado la naturaleza severa de la enfermedad, con altos niveles de mortalidad próximos al 35 %, especialmente en personas de edad avanzada, inmunocomprometidas y mujeres embarazadas (Rocourt *et al.* 2003).

*L. monocytogenes* pertenece al género *Listeria* y junto a *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocurtia*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* y *L. grandensis* forman el grupo de las 14 especies de *Listeria*, de las cuales únicamente *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patogénicas (Bertsch *et al.* 2013; Halter *et al.* 2013; den Bakker *et al.* 2014). De entre ellas, las especies más comunes en los alimentos son *L. innocua* y *L. monocytogenes* (Kozak *et al.* 1996). *L. ivanovii* se asocia principalmente a infecciones producidas en rumiantes, aunque ha habido algún caso esporádico en humanos (Cummins *et al.* 1994; Şahin y Beytut 2006; Guillet *et al.* 2010). Por otra parte, como ya se ha comentado, *L. monocytogenes* es un patógeno virulento transmitido por los alimentos, que puede causar una infección grave en rumiantes y humanos, llamada listeriosis. Hasta el momento, se

han identificado por lo menos 13 serotipos distintos, que son: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e y 7. Sin embargo, sólo los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b, han sido implicados en el 98 % de los casos humanos de listeriosis en todo el mundo (Kathariou 2002; Chenal-Francisque *et al.* 2011). Estos 13 serotipos se agrupan en 4 linajes distintos (I, II, III y IV), definidos mediante el empleo de métodos de tipificación molecular, como por ejemplo la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Orsi *et al.* 2011). Se ha observado que los distintos serotipos pueden generar estructuras poblacionales diferentes y pueden llegar a tener diferentes habilidades para combatir el estrés ambiental (Wiedmann *et al.* 1997; Dunn *et al.* 2009).

## 5.2. Descripción, incidencia e impacto de la listeriosis

*L. monocytogenes* es el agente causal de la listeriosis humana y su ruta de transmisión principal es el consumo de alimentos contaminados con este patógeno (Swaminathan y Gerner-Smidt 2007). Aunque los productos que están mayoritariamente asociados con la presencia de *L. monocytogenes* sean el queso tierno y los productos cárnicos *Ready To Eat* (RTE), no es raro tampoco encontrarlo en productos frescos como las frutas, vegetales, productos de la pesca y otros productos lácteos (Cartwright *et al.* 2013; Mritunjay y Kumar 2015).

Para desarrollar la infección, se requieren de entre 10 a 100 millones de unidades formadoras de colonias (UFC) para un individuo sano y de entre 0,1 a 10 millones de UFC para individuos que se consideran como grupo de riesgo (mujeres embarazadas, niños, personas inmunocomprometidas y ancianos) (Bortolussi 2008). A diferencia de otras enfermedades transmitidas por los alimentos, la listeriosis puede tener largos períodos de incubación, llegando a variar entre 2 y 70 días (Goulet *et al.* 1998). La enfermedad puede manifestarse de dos formas distintas, la listeriosis adulta y la neonatal. En adultos se ha descrito una sintomatología muy variada que va desde gastroenteritis febril, en individuos sanos, hasta infecciones graves, como septicemia, meningitis y encefalitis, en los grupos considerados de riesgo. En la listeriosis neonatal, la infección del feto puede conllevar el aborto, infecciones neonatales o muerte del recién nacido (Bortolussi 2008; Velge y Roche 2010).

En cuanto a la incidencia, la mayoría de los casos de listeriosis son producidos por cepas de *L. monocytogenes* que pertenecen a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, en menor medida, 1/2c. Curiosamente, los aislados del serotipo 1/2 son altamente prevalentes en los entornos del procesado de los alimentos, en comparación con los aislados del serotipo 4b (Kathariou 2002; Cartwright *et al.* 2013).

Aunque la exposición de este microorganismo es amplia, la listeriosis es una enfermedad poco frecuente, normalmente descrita como casos aislados o como pequeños brotes con un reducido número de casos. De manera ocasional, pueden aparecer grandes brotes epidémicos (Hernandez-Milian y Payeras-Cifre 2014). En Europa, se ha observado una tendencia creciente entre 2012 y 2016, con 2.536 casos de listeriosis humana confirmados en 2016. La incidencia global de la enfermedad en 2016 fue de 0,47 casos por 100.000 personas, suponiendo un incremento del 9,3 % en comparación con el año anterior y con un porcentaje de mortalidad de 16,2 % (EFSA-ECDC 2017).

### **5.3. Adhesión y transferencia**

La capacidad de *L. monocytogenes* para adherirse a diferentes materiales empleados en la industria alimentaria, como superficies de contacto con alimentos, ha sido extensamente estudiada (Mafu *et al.* 1990; Sinde y Carballo 2000; Chae *et al.* 2006). Existen diferentes factores que condicionan al anclaje inicial de *L. monocytogenes* en estas superficies, destacando entre ellos el tipo de superficie empleada, la cepa bacteriana, la cantidad de nutrientes disponibles, la presencia de otros microorganismos que puedan competir, la corrosión de la superficie o la humedad. De hecho, de acuerdo con el estudio realizado por Mai *et al.* (2006), la humedad es un determinante primario en la adhesión de este patógeno, ayudándolo a distribuirse sobre la superficie.

Se ha demostrado que la adhesión de *L. monocytogenes*, así como de cualquier otro microorganismo, facilita la posterior recontaminación desde la misma superficie hacia los alimentos (Rodríguez y McLandsborough 2007). Tradicionalmente, la mayoría de los estudios en relación a la transferencia microbiana se llevaban a cabo en hospitales, debido al importante papel que desencadena la transferencia bacteriana en infecciones adquiridas en estos lugares (Haynes y Hench 1965; Weber y Rutala 1997; Avila-Agüero *et al.* 2004).

No obstante, la importancia que este fenómeno tiene para la industria alimentaria ha estado atrayendo mucha atención para el sector, desde hace poco más que una década, por lo que ha llevado a los investigadores a querer estudiarlo y cuantificarlo (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Estudios sobre la transferencia de *L. monocytogenes* desde superficies de contacto con alimentos a productos alimenticios. Modificado de Aarnisalo (2007a).

Transferencia		Referencia
Desde	Hacia	
Hoja de corte de acero inoxidable	Pechuga de pavo, mortadela, salami, y superficies de corte	Vorst <i>et al.</i> (2006a)
	Pavo asado al horno, mortadela, salami, y cinta transportadora	Lin <i>et al.</i> (2006)
Cuchillos de cocina de acero inoxidable	Pechuga de pavo, mortadela y salami; superficies de corte	Vorst <i>et al.</i> (2006b)
Acero inoxidable, Policloruro de vinilo (PVC) y Poliuretano (PU)	Carne de vacuno	Midelet y Carpentier (2002)
Acero inoxidable y polietileno de alta densidad	Mortadela y queso americano	Rodríguez y McLandsborough (2007)
Superficies en contacto con los alimentos, guantes, ambiente	Productos de la pesca	Ivanek <i>et al.</i> (2004)
Ambiente de procesado de alimentos	Diferentes productos	Schaffner (2004)
Naranjas inoculadas	Superficies de trabajo	Martínez-Gonzales <i>et al.</i> (2003)

En el caso de *L. monocytogenes*, se ha podido evidenciar que ésta se transfiere fácilmente desde una superficie de contacto alimentario a distintos productos. Hay superficies más críticas que otras, donde suele suceder este fenómeno con más probabilidad. Entre ellas destacan las cuchillas de las máquinas loncheadoras y fileteadoras de carne y las cintas transportadoras de los alimentos (Aarnisalo 2007a). Entre los estudios realizados hasta el momento, se ha puesto de manifiesto que la transferencia de *L. monocytogenes* se ve potenciada cuando hay una gran cantidad de células adheridas, cierta hidratación del sistema y una elevada fuerza mecánica en las cuchillas de corte.

#### 5.4. Persistencia

La persistencia se define como la capacidad que tiene un patógeno para sobrevivir en cualquier entorno, como el suelo, agua, animales, personas o instalaciones de procesamiento de alimentos, entre otros, durante un período prolongado de tiempo (Donlan, 2001; Thévenot *et al.* 2005). Las bacterias pueden persistir en ambientes estresantes gracias a la ayuda de ciertos mecanismos fisiológicos y genéticos, que incluyen la formación de cápsulas, la formación de endosporas, formas viables pero no cultivables (VBNC) y la formación de biofilms (Costerton *et al.* 1995; Colwell 2000; Gibson *et al.* 2006). Estos mecanismos de adaptación han facilitado, a modo general, la larga persistencia de patógenos en sus respectivos hábitats.

En la industria alimentaria, la persistencia de *L. monocytogenes* se ha caracterizado por el aislamiento, en repetidas ocasiones, de un determinado subtipo durante un concreto periodo de investigación (Ferreira *et al.* 2014). De hecho, se ha podido demostrar que este patógeno puede persistir en entornos de procesamiento de alimentos desde varios meses a varios años (Dauphin *et al.* 2001; Vogel *et al.* 2001; Ortiz *et al.* 2010). Esto se debe a la habilidad que pueden tener distintas cepas para adaptarse mejor a los cambios en el medio ambiente, en comparación con otras cepas que se encuentran esporádicamente (Lundén *et al.* 2000; Autio *et al.* 2003). No obstante, no se ha encontrado, por el momento, que cepas aisladas de *L. monocytogenes* persistentes puedan tener un mayor potencial patogénico, comparadas con sus contrapartes esporádicas (Nightingale *et al.* 2005; Jensen *et al.* 2008a; Jensen *et al.* 2008b). Sin embargo, el riesgo de contaminación de los alimentos y la probabilidad de que haya más casos de listeriosis, aumenta con los aislamientos, que tienden a persistir por más tiempo en las plantas procesadoras de alimentos (Fox *et al.* 2011; Lambertz *et al.* 2013). De hecho, hay algunos informes que han encontrado una estrecha relación entre la persistencia de aislados en industria alimentaria y brotes de listeriosis (Olsen *et al.* 2005; Orsi *et al.* 2011).

Se ha descrito que *L. monocytogenes* sobrevive y persiste en ambientes industriales, debido a la formación de biofilms (Norwood y Gilmour 1999; Tompkin 2002). Es por esta razón que, desde las últimas dos décadas, se han dedicado numerosos esfuerzos a estudiar la formación de biofilms de *L. monocytogenes*, con la esperanza de diseñar

enfoques para abordar su persistencia en la industria de los alimentos y poder eliminarlos (Blackman *et al.* 1996; Harvey *et al.* 2007; Piercey *et al.* 2016).

Debido a la gran repercusión que tienen para la industria alimentaria y a su papel principal en la persistencia, la formación de biofilms de *L. monocytogenes* será el foco principal de esta tesis. En la siguiente sección se discutirán diferentes aspectos en cuanto a la formación de biofilms, así como también su relación con el entorno de procesado de alimentos de origen cárnico.

## 6. Biofilms

En el medio ambiente las bacterias se pueden encontrar en dos estados distintos. El primero sería flotando libremente, estado que se denomina planctónico y que tiene especial relevancia para la propagación de los microorganismos. El segundo sería adheridas a una superficie, estado que se denomina sésil y que es completamente necesario para permitir a los microorganismos persistir y resistir a las condiciones adversas del medio.

En relación a la adhesión de los microorganismos, hay dos teorías principales, entre las que destacan (Busscher *et al.* 1984):

1. Para que los microorganismos se adhieran a una superficie, son necesarias las fuerzas de Lifshitz-Van der Waals (fuerzas de atracción y repulsión).
2. La adhesión es una cuestión termodinámica, basada en la energía libre de adhesión, que se deriva de las energías libres de la superficie de la célula y la del sustrato.

Además, según estos mismos autores, hay factores que también pueden contribuir a esta adhesión, como serían los apéndices de las superficies celulares o la secreción de sustancias adhesivas que ayudan a la fijación celular.

Los microorganismos tienen la capacidad de adherirse a superficies vivas o inertes, formando agregados celulares que se mantienen unidos entre sí, gracias a que se

encuentran embebidas en una matriz autoproducida, constituida por un conglomerado de distintos tipos de biopolímeros compuestos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), proteínas y ADN extracelular (ADNe) (Costerton *et al.* 1995; Donlan 2001). El EPS forma el esqueleto para la generación tridimensional de la estructura y juega un papel clave en la adhesión a las superficies y la cohesión (Flemming y Wingender 2010). Estas comunidades microbianas adheridas a superficies son conocidas como biofilms.

La formación de biofilms se conoce desde el siglo XVII por Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), que observó por primera vez microorganismos sobre la superficie de los dientes, mediante un microscopio de construcción propia (Donlan y Costerton 2002). No fue hasta mitades del siglo XX cuando se describen con más detalle, se identifica su importancia para la supervivencia de microorganismos y se relacionan con la transmisión de ETAs (Heukelekian y Heller 1940; Zobell 1943; Jones *et al.* 1969). No obstante, Nutman *et al.* (2016) señalan que esta forma de vida se puede remontar a unos 3.700 millones de años, ya que se han encontrado registros fósiles con acumulaciones sucesivas de biofilms calcificados.

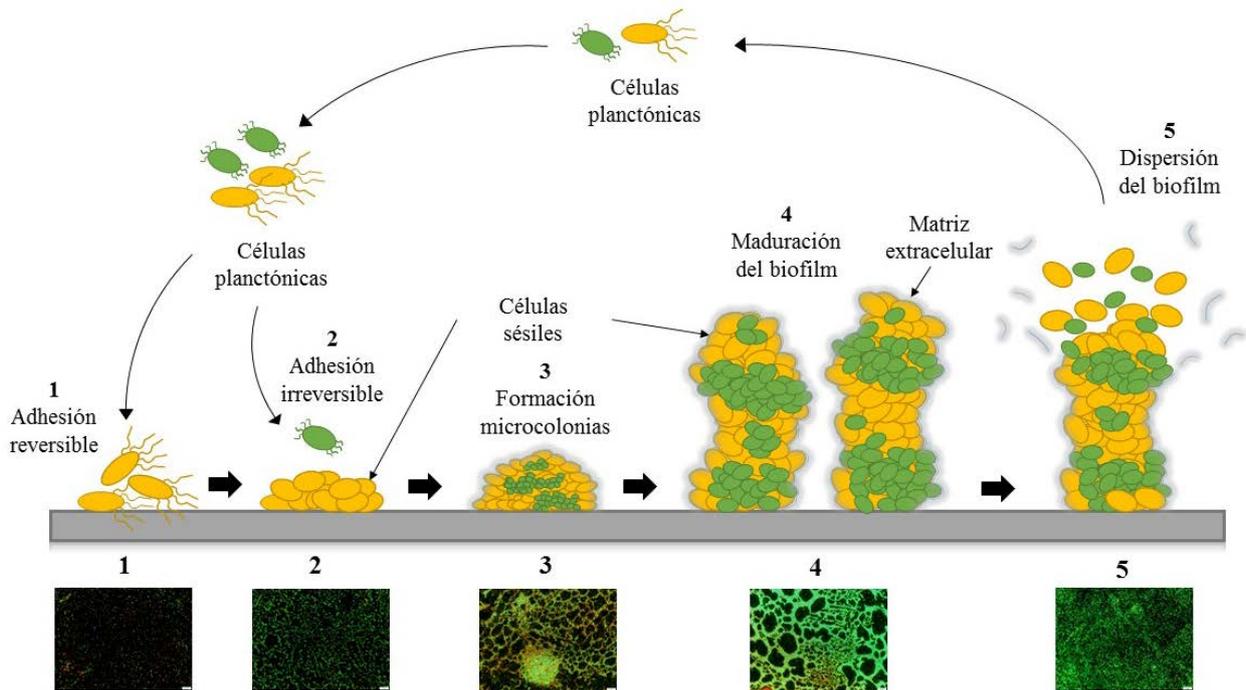
Las células que conforman estos biofilms pueden adquirir nuevas características, a través de la transferencia horizontal de genes, están protegidas de las fluctuaciones ambientales, pueden cooperar entre ellas para acceder a una mayor disponibilidad de alimentos e incrementar su eficiencia metabólica (Davey y O'Toole 2000). Estas estructuras confieren resistencia a las células frente a agentes antimicrobianos, luz ultravioleta, desecación y tratamientos con desinfectantes, en comparación con las mismas células cuando se encuentran en estado plantónico (Borucki *et al.* 2003). Además, la capacidad que tienen las bacterias para sobrevivir al estrés ambiental relacionado con los entornos de procesamiento de los alimentos, como son la refrigeración, la desinfección, la acidez y la salinidad, se ve incrementada con la formación de biofilms (Giaouris *et al.* 2014).

Las comunidades de microorganismos que conforman los biofilms pueden estar compuestas por una o por múltiples especies (Davey y O'Toole 2000). No obstante, en la industria alimentaria los biofilms no suelen estar formados por simples agrupaciones tridimensionales de células idénticas, sino por sub-poblaciones heterogéneas con comportamientos distintos, que contribuyen al éxito global del biofilm (Bridier *et al.* 2015). Los biofilms multiespecie han demostrado ser más resistentes a biocidas que los

monoespecie. Esto se debe, en parte, a su estructura más compleja (Teh *et al.* 2010; van der Veen y Abee 2011; Giaouris *et al.* 2013; Sanchez-Vizueté *et al.* 2015). Por ejemplo, *E. coli* O157:H7 puede llegar a producir una cantidad de biomasa 400 veces mayor cuando coexiste en biofilms conjuntamente con *Acinetobacter calcoaceticus*, en comparación con el monocultivo bajo las mismas condiciones ambientales (Habimana *et al.* 2010). Una de las explicaciones propuestas para justificar el motivo por el cual los biofilms conformados por múltiples especies tienen una resistencia a biocidas superior, en comparación a los monoespecie, es la naturaleza específica y la composición de la matriz. Se ha demostrado que las interacciones entre microorganismos potencian la formación de estas estructuras para poder protegerse eficientemente del entorno en general (von Canstein *et al.* 2002; Burmølle *et al.* 2006). De manera similar, debido a que un biocida puede inactivarse en la matriz de un biofilm por enzimas, éstas pueden actuar sinérgicamente contra los compuestos tóxicos; para que las especies no productivas se beneficien de la asociación a través de la complementación enzimática (Shu *et al.* 2003). Por ejemplo, Stewart *et al.* (2000) observaron que el peróxido de hidrógeno era capaz de penetrar y dañar parcialmente a las células de *P. aeruginosa*, que conformaban un biofilm, cuando éstas eran deficientes en la enzima catalasa. Otra posible explicación es que, debido a la disposición espacial específica de ciertas especies microbianas dentro de un biofilm, algunas de las cepas que lo conforman pueden protegerse de un biocida mediante su agregación con otras dentro de la estructura tridimensional. No obstante, resulta interesante destacar que, a nivel industrial, el biocida aplicado podría tener un efecto menor debido a la concentración de uso. Habitualmente, los biocidas se aplican a concentraciones alrededor del 1 %. Esto significa que cada litro de agua posee 10 g de biocida y ocupa aproximadamente 1 m<sup>2</sup>. Por tanto, hay una repartición de los 10 g en un espacio tan grande que resulta posible que haya menos biocida del realmente necesario.

### **6.1. Proceso de formación de biofilms**

La formación de biofilms es un proceso dinámico, que se da de forma secuencial y que incluye cinco etapas principales: 1) Fijación reversible de células individuales a una superficie; 2) Unión irreversible a la superficie; 3) Formación de microcolonias; 4) Maduración del biofilm; y finalmente, 5) Disociación de las células y colonización de una nueva superficie (**Figura 5**) (Costerton *et al.* 1995; Donlan 2001)



**Figura 5.** Representación de las etapas de formación de biofilms compuestos por múltiples especies. La formación de biofilms incluye 5 etapas identificadas como: (1) unión reversible, (2) unión irreversible, (3) formación de microcolonias, (4) maduración del biofilm y (5) dispersión del biofilm. Las imágenes en la parte inferior obtenidas por microscopía de epifluorescencia directa muestran cada una de las 5 etapas de desarrollo de biofilms de *L. monocytogenes*.

### 6.1.1. Fijación reversible de células individuales a una superficie

En el primer paso para la formación de biofilms, los microorganismos en estado planctónico se aproximan a la superficie, mediante una serie de procesos fluidos dinámicos, en los que se incluye el movimiento browniano y los efectos gravitacionales (Characklis 1981). Una vez se encuentran cerca de la superficie se unen activamente a ésta por medio de apéndices, tales como los pilis, flagelos, fimbrias, o proteínas de membrana externa. Éstos se consideran factores reguladores para la adhesión inicial (van Houdt y Michiels 2010). Las superficies, tal y como se ha discutido anteriormente, pueden tener diferentes características físico-químicas, importantes para determinar la velocidad y el alcance del proceso de unión. Además, las superficies expuestas a un medio acuoso, pueden recubrirse por moléculas y precondicionarlas, modificando las características físico-químicas que pueden inhibir o promover la unión microbiana. Pese a que las propiedades físico-químicas de la membrana celular de las bacterias y la acumulación de

residuos orgánicos sobre las superficies de contacto con alimentos, pueden actuar como condicionantes y favorecer la adhesión inicial de las células, se ha indicado que es un conjunto de diferentes factores el que estimula la adhesión inicial de las mismas (Chew y Yang 2017; Ren *et al.* 2018).

Aunque todos los factores sean favorables para la adhesión microbiana, el anclaje inicial es un proceso reversible y completamente dinámico y, por tanto, las células pueden volver al estado planctónico mediante fuerzas hidrodinámicas y repulsivas, así como a la disponibilidad de nutrientes (Dunne 2002; Wu y Outten 2009).

### **6.1.2. Unión irreversible a la superficie**

Los microorganismos débilmente unidos consolidan el proceso de adhesión mediante la producción de diversas sustancias, como exopolímeros y adhesinas, que se acomplejan con los materiales de la superficie, haciendo que su adhesión se vuelva irreversible (Dunne 2002). Esta fijación irreversible a la superficie está a su vez relacionada con la secreción de distintas moléculas, que intervienen en la comunicación celular, aspecto que se discutirá más adelante.

*L. monocytogenes* tiene la capacidad de poder moverse y anclarse a superficies sólidas, ya que, entre otros, posee flagelos en su pared celular. La bacteria puede adherirse a muchos de los materiales empleados en la industria alimentaria, como por ejemplo el acero inoxidable, caucho, o diferentes materiales plásticos. El proceso de adhesión y formación de biofilms, por parte de esta bacteria, es relativamente rápido. Se ha podido observar que *L. monocytogenes* se adhiere a superficies de acero inoxidable en tiempos de alrededor de 20 minutos, estableciendo un anclaje irreversible en un periodo de 1 hora (Lundén 2004).

### **6.1.3. Formación de microcolonias**

La unión de células microbianas a un sustrato va seguida del crecimiento microbiano, mediante el empleo de nutrientes presentes en la película de acondicionamiento y los

fluidos circundantes del medio ambiente. Este proceso desarrolla microcolonias, que se ensanchan y se unen para formar películas de células que cubren la superficie. Al mismo tiempo, se observa un reclutamiento de microorganismos adicionales del entorno local (Kumar y Anand 1998). A medida que se producen las microcolonias, los microorganismos crecen y con ello producen y acumulan diferentes sustancias, como por ejemplo polímeros extracelulares, que finalmente se incrustan e inmovilizan para generar una matriz. En muchos casos, estos cambios implican a su vez una pérdida de flagelos y otras estructuras que han intervenido en la adhesión inicial. Por ejemplo, se ha determinado que *P. aeruginosa* empieza a transcribir el gen *algC* justo en el momento en que se ancla a la superficie, lo que conduce a una inhibición de la síntesis de flagelos y al aumento de la síntesis de alginato, uno de los principales componentes de la matriz que forma esta especie cuando genera el biofilm (Davey y O'Toole 2000). En el caso de *L. monocytogenes* se ha podido apreciar, que cuando ésta se adhiere a la superficie, se reduce la movilidad celular y su posible capacidad de autólisis (Monk *et al.* 2004).

El bloque de construcción básico de los biofilms son las microcolonias. Es por esta razón que los procesos básicos que intervienen en los biofilms tales como la comunicación microbiana, la resistencia a los desinfectantes, la producción de diferentes sustancias que forman la matriz y la aptitud de las especies de coexistir en las superficies, se han investigado a partir de estas estructuras (Jahid y Ha 2014).

#### **6.1.4. Maduración del biofilm**

La maduración es la etapa más estable en la formación de biofilms. Aquí es donde las poblaciones sésiles pueden existir como agregados de monocapa o multicapa, generando conglomerados celulares que pueden tener diferentes formas, que se rodean por una matriz, que incluye canales de agua para el transporte de nutrientes y gases, y que tienen un comportamiento descrito como el de los materiales viscoelásticos (Klapper *et al.* 2002). Los microorganismos metabólicamente más activos se mantienen en las capas más superiores, más porosas y cerca de los canales de agua del biofilm. Estos canales permiten la dispersión e intercambio de metabolitos, moléculas orgánicas y cationes metálicos. Los nutrientes son así atrapados y concentrados en la matriz del biofilm y se difunden a través de ella. La mayor parte del transporte de solutos dentro de la estructura del biofilm se rige

por la difusión entre los canales de agua y las células que lo conforman, la cual difiere en gran medida a diferentes profundidades del biofilm (Nadell *et al.* 2009; Persat *et al.* 2015). Los gradientes químicos que se generan, crean micronichos ambientales, que permiten la coexistencia de diversas especies.

La matriz que envuelve al biofilm confiere protección contra las condiciones adversas que pueden existir sobre los microorganismos que lo conforman, concentran nutrientes para su alimento, previenen el acceso de biocidas y la desecación, secuestrando metales y toxinas. Todo esto dificulta su eliminación, requiriendo la aplicación de tratamientos como lavados, raspados sobre las superficies o rotura química de las fuerzas de fijación, mediante la aplicación de detergentes, tensoactivos, desinfectantes y calor (Sauer 2003; van Houdt y Michiels 2010).

En la industria alimentaria, por lo general, los biofilms están formados por múltiples especies. Se ha demostrado que la proporción de especies presentes en el biofilm es desigual y varía en función de la propensión a formar estas estructuras (Stoodley *et al.* 2001). Los biofilms mixtos, en su estado de madurez, son más estables y resistentes a los productos químicos de limpieza ya que poseen una estructura más compleja.

#### **6.1.5. Disociación de las células y colonización de una nueva superficie**

Los biofilms microbianos forman parte de un proceso cíclico, siendo la dispersión la etapa final de su ciclo de vida. Coordinadas por señales, las comunidades de células que conforman los biofilm también tienen la opción de moverse a través de su entorno en masas, mientras conservan sus asociaciones espaciales y su integración metabólica, o pueden desprenderse de la matriz y entrar en el flujo de corriente (Cappitelli *et al.* 2014). Las células separadas del biofilm pueden trasladarse a una nueva ubicación y volver a adherirse para empezar de nuevo el ciclo.

Los mecanismos de dispersión de los biofilms pueden ser activos o pasivos. La dispersión activa hace referencia a todos aquellos mecanismos que son iniciados por las propias bacterias. El desprendimiento puede ser debido a condiciones de bajos nutrientes como mecanismo de supervivencia, y puede estar determinado genéticamente. Por esta razón,

el desapego es algo importante para escapar de hábitats desfavorables, y de esta forma generar nuevos nichos (Percival *et al.* 2011). Por otra parte, la dispersión pasiva hace referencia al desprendimiento de células que conforman los biofilms y que está mediado por fuerzas externas. Hasta la fecha, se han identificado tres modos distintos de dispersión de los biofilms: la erosión, el desprendimiento y la siembra. El primero es la liberación continua de células individuales o pequeños grupos de células del biofilm, a niveles bajos en el curso de su formación. El segundo, está relacionado con el desprendimiento repentino de grandes porciones del biofilm, generalmente durante las etapas posteriores a su formación. El último hace referencia a la liberación rápida de un gran número de células individuales o pequeños grupos de células, de cavidades huecas, que se forman dentro de la comunidad del biofilm (Kaplan 2010).

## **6.2. Ventajas para las células que conforman los biofilms**

Los biofilms confieren a las células que lo conforman un modo de protección para su crecimiento y, a su vez, permite que las bacterias sobrevivan en entornos con condiciones desfavorables, ya sea por cambios en el medio, depredadores, agentes químicos o físicos agresivos, antibióticos o agentes desinfectantes (Costerton *et al.* 1999). Por el momento, se han descrito cuatro principales ventajas para un microorganismo cuando crece en biofilms. Éstas son: (i) la protección frente a condiciones adversas (entre ellos la presencia de agentes microbianos); (ii) el incremento de la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento; (iii) incremento de la unión a moléculas de agua, reduciendo el riesgo a la deshidratación y (iv) proximidad a otras bacterias, lo que facilita el intercambio genético (Jefferson, 2004).

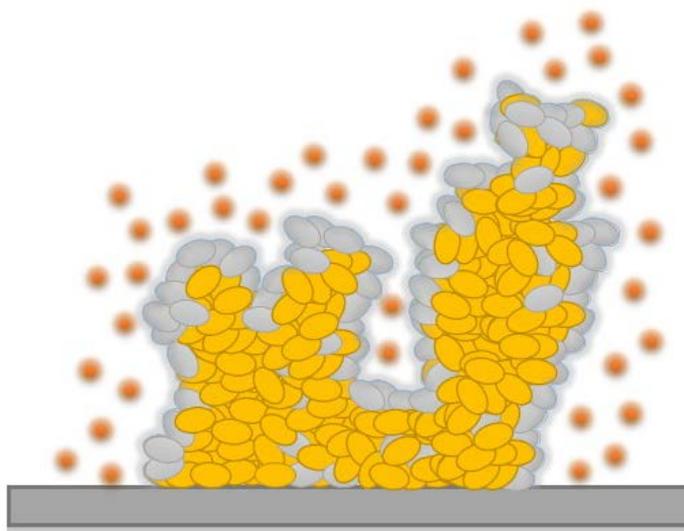
De entre todas ellas, la que tiene una mayor repercusión para la industria alimentaria, porque influye directamente en la efectividad de las operaciones de limpieza y desinfección, es la resistencia a los agentes antimicrobianos. Numerosos son los estudios que demuestran que la eficacia antimicrobiana de los desinfectantes se ve disminuida cuando las bacterias conforman un biofilm, en comparación a cuando estas mismas se encuentran en estado planctónico. Norwood y Gilmour (2000) indicaron que 10 ppm de cloro eran suficientes para tener un efecto biocida significativo para células en estado planctónico, pero que cuando éstas se encontraban conformando un biofilm, como

mínimo se requería una concentración 100 veces superior. Este incremento de la resistencia a biocidas, lejos de estar asociada con los niveles de adherencia de la bacteria o su sensibilidad al biocida en estado planctónico, se relaciona con el desarrollo y la estructura del biofilm. De esta manera, la mayor resistencia se da en biofilms maduros con una estructura compleja (Saá Ibusquiza *et al.* 2011). Por esta razón, los estudios para conocer en qué grado se eliminan estas estructuras *in vitro* deberían replicar con el mayor grado de similitud posible lo que se encuentra en la industria, es decir, biofilms maduros. Muchos de los estudios realizados hasta el momento, se han realizado con células adheridas y formando microcolonias, en vez de estudiarse con modelos de biofilms maduros y robustos, con más tiempo de incubación. Hoy en día sería muy importante que se adaptaran los protocolos existentes para la formación de biofilms y estandarizarlos. Más aún, sería muy interesante si se pudiesen reproducir las condiciones exactas que se encuentran en la industria alimentaria. De esta manera, los estudios que se hicieran podrían obtener conclusiones más claras y representativas.

Entre los mecanismos a los que se les atribuye esta mayor resistencia de los microorganismos frente a los desinfectantes, cuando están en modo biofilm, hay que destacar una difusión lenta o incompleta del biocida en el interior del biofilm, una distinta fisiología de las células que lo conforman, una diferenciación de una parte de la población a células persistentes o una expresión de distintas respuestas de adaptación al estrés (Jefferson 2004), quizás podría también darse una combinación de todas las anteriores.

En la **Figura 6** se muestra la difusión insuficiente de un biocida en el interior de un biofilm. La matriz extracelular que rodea las células actúa como un filtro que no deja pasar moléculas con carga eléctrica elevada, como podrían ser determinados biocidas. De esta manera, el biocida solo podrá estar en contacto con las zonas más próximas a la superficie de la estructura y, por tanto, las únicas células que se van a ver comprometidas, porque estarán expuestas a concentraciones elevadas de biocida, serán aquellas que estén a un nivel más superficial. Justamente estos microorganismos superficiales son los que se muestran metabólicamente más activos. Aquellas células situadas en zonas más internas del biofilm no entrarán en contacto con el biocida o, en el caso de que entren, serían expuestas a concentraciones subletales. Es de esperar que en esta situación su viabilidad no se vería comprometida. No obstante, esto podría desencadenar al desarrollo de resistencias al biocida, por parte de estos microorganismos. En un estudio publicado por

Martínez-Suárez *et al.* (2016) se determinó que algunas cepas de *L. monocytogenes*, persistentes en industrias alimentarias, eran más resistentes a distintos desinfectantes, entre ellos al amonio cuaternario, y que lejos de ser una adaptación fenotípica se trataba de una resistencia genotípica adquirida, lo que tiene implicaciones importantes en los ambientes de procesado industrial. Se determinó también que la exposición de *L. monocytogenes* a concentraciones subinhibitorias de amonio cuaternario y la consecuente selección de microorganismos resistentes, podía aumentar la capacidad de estas bacterias para formar biofilms y sobrevivir al tratamiento de desinfección posterior, con altas concentraciones de los mismos compuestos (Martínez-Suárez *et al.* 2016; Tezel y Pavlostathis 2015).



**Figura 6.** Difusión incompleta de una sustancia biocida, representada en color naranja, en el interior de un biofilm maduro compuesto por células vivas (color amarillo) y células muertas (color gris). El biocida no es capaz de penetrar la matriz extracelular y se limita a actuar con las bacterias más superficiales, de manera que las bacterias que se encuentran en el interior permanecen vivas.

### 6.3. *Matriz extracelular de biofilms compuestos por L. monocytogenes*

Debido a que durante mucho tiempo ha habido cierta controversia, en cuanto a las sustancias que conforman la matriz extracelular de los biofilms producidos por *L.*

*monocytogenes*, se han realizado muchos estudios para ver qué componentes constituyen la matriz que rodea a los biofilms, por parte de diferentes cepas de esta bacteria. Por el momento, los compuestos observados en la matriz extracelular se resumen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Componentes estructurales de la matriz extracelular de *L. monocytogenes* caracterizados hasta el momento. Modificado de Colagiorgi *et al.* (2016).

Matriz extracelular	Moléculas	Características	Referencia
Polisacáridos	Poli-(1,4)- <i>N</i> -acetilmannosamina (poli-NAM) Ácido teicoico	Los ácidos teicoicos son los principales componentes de la matriz de los biofilms de <i>Listeria</i>	Brauge <i>et al.</i> (2016)
		Los mutantes del gen <i>dltABCD</i> presentan una reducción en la capacidad de formación de biofilms	Alonso <i>et al.</i> (2014)
		La biosíntesis de poli-NAM se activa con altos niveles de c-di-GMP	Köseoğlu <i>et al.</i> (2015)
Proteínas	InlA BapL PlcA FlaA PBP ActA Lmo2504	El tratamiento con proteinasa K disminuye el desarrollo de los biofilms, lo que sugiere una implicación proteica en la unión inicial	Longhi <i>et al.</i> (2008); Nguyen y Burrows, (2014)
		BapL puede contribuir a la unión inicial de algunas cepas de <i>L. monocytogenes</i>	Jordan <i>et al.</i> (2008)
		La motilidad flagelar tiene un papel crítico en la formación de biofilm	Lemon <i>et al.</i> (2007); Lourenço <i>et al.</i> (2013)
		El tratamiento con DNase I inhibe o retrasa la unión inicial de las bacterias a las superficies, lo que sugiere la participación de eDNA en la unión inicial	Nguyen y Burrows (2014)
		Asegura la integridad estructural del biofilm en cooperación con proteínas y polisacáridos	Zetzmann <i>et al.</i> (2015)
ADN extracelular		Involucrado en la transferencia de genes horizontal	Harmsen <i>et al.</i> (2010)
		Puede servir como fuente de energía y nutritiva	Guilbaud <i>et al.</i> (2015)
		El ADN extracelular es liberado por bacterias dañadas	Harmsen <i>et al.</i> (2010); Zetzmann <i>et al.</i> (2015)

La matriz extracelular es un componente muy importante dentro de los biofilms y puede representar más de 90 % de la masa total de estas estructuras (Flemming y Wingender 2010). Por lo general, de entre las principales moléculas que la constituyen destacan

exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular (ADNe). Los estudios centrados en la caracterización de biofilms de *Listeria* han mostrado la presencia de todas estas estructuras (Colagiorgi *et al.* 2017). Por el momento, se ha observado que los ácidos teicoicos (AT) son los principales polisacáridos que constituyen la matriz que envuelve a los biofilms de *L. monocytogenes*. Esto se pudo observar ya que, en el estudio realizado por Brauge *et al.* (2016) demostraron que, los AT obtenidos en el análisis, tenían una estructura muy similar a los AT aislados de la pared celular de esta bacteria. Además, en el estudio se comprobó también que cepas mutantes de *L. monocytogenes* que no contenían AT, presentaron en la matriz una fracción de carbohidrato extracelular idéntica a las moléculas modificadas de la pared celular. Estos hallazgos sugieren que los AT extracelulares y de pared celular pueden tener el mismo origen, y éste sea probablemente derivado de la autólisis y el desprendimiento de la pared celular de las bacterias. Por tanto, como la pared celular de *Listeria* está compuesta por AT, en la matriz van a predominar los AT.

A diferencia de los biofilms formados por otras especies de microorganismos, como por ejemplo las cepas mucoides de *P. aeruginosa*, las cuales tienen como principal componente en la matriz extracelular a los polisacáridos (Evans y Linker 1973), la cuantificación de los componentes extracelulares de los biofilms de *L. monocytogenes*, realizada por Combrouse *et al.* (2013) indicaron que las proteínas eran los compuestos más abundantes entre las sustancias extracelulares. Otros autores también han observado que tratamientos de biofilms de *L. monocytogenes* con proteasa pueden desencadenar una alteración del desarrollo del biofilm o inducir la dispersión de las células que lo conforman, indicando el papel clave que tienen las proteínas en el desarrollo y mantenimiento del mismo (Longhi *et al.* 2008; Nguyen y Burrows 2014). De entre las proteínas encontradas, las que más destacan, por el papel que desencadenan en la estructura del biofilm, son algunas extracelulares y de superficie, como por ejemplo la internalina A o la BapL (Franciosa *et al.* 2009). Recientemente se ha descrito que la internalina L también juega un papel importante en la adhesión bacteriana inicial y el posterior desarrollo de biofilms en la cepa de *L. monocytogenes* EGD-e (Popowska *et al.* 2017). Finalmente, el ADNe también reside dentro de los biofilms de *L. monocytogenes*, demostrando servir como componente estructural de éstos (Nguyen y Burrows 2014; Zetzmann *et al.* 2015). Además, el ADNe no sólo tiene un papel estructural, sino que

también sirve como fuente de energía y nutrientes (Flemming y Wingender 2010; Harmsen *et al.* 2010).

#### **6.4. Repercusión de los biofilms en la industria cárnica**

En la industria alimentaria se considera que la presencia de biofilms en las superficies es un problema potencial, ya que pueden actuar como un vehículo de transmisión y una fuente de contaminación microbiológica persistente, con unas consecuencias importantes, tanto a nivel de seguridad alimentaria, como de calidad de los alimentos. La protección que ejercen estas estructuras, sobre las células que lo conforman, conlleva una menor eficacia de los tratamientos de desinfección realizados. Esto facilita la supervivencia microbiana. De igual modo, partes residuales de la matriz exopolimérica, que hayan quedado remanentes en la superficie, porque no se hayan eliminado por los procedimientos de limpieza y desinfección, proporcionan un espacio para el anclaje de otros microorganismos que puedan llegar al sistema (Hood y Zottola 1997).

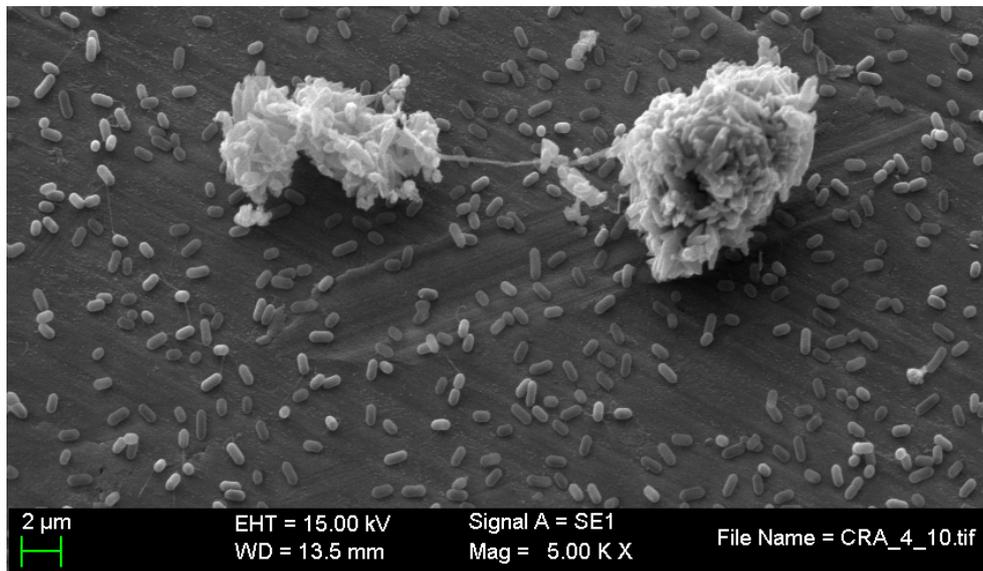
En la industria cárnica, la probabilidad que las superficies y materiales, como tuberías, cuchillos, ganchos, juntas o cintas transportadoras, entre otros, sean colonizadas por microorganismos, si los procedimientos de limpieza y desinfección son inadecuados o ineficientes, es muy elevada (Giaouris *et al.* 2014). En esta industria, se ha estudiado la adhesión y formación de biofilms por parte de *E. coli* O157: H7 en superficies en contacto con carnes de ganado, concluyendo que, a temperaturas de refrigeración, las bacterias pueden crecer y desarrollar biofilms (Dourou *et al.* 2011). Los restos orgánicos derivados del procesado de la carne también son un medio apropiado para el desarrollo de microorganismos y la posterior formación de estas estructuras de protección (Srey *et al.* 2013).

La presencia de biofilms en la industria cárnica, aparte de causar problemas a nivel de salud pública y deterioro de productos, también pueden ocasionar problemas en las instalaciones y equipos de procesado de alimentos, como la disminución de la capacidad de transferencia de calor y el flujo de las conducciones, o el incremento de la velocidad de corrosión de las superficies (Kumar y Anand 1998).

## 7. Quorum sensing

### 7.1. Comunicación celular

El *quorum sensing*, también conocido como la comunicación celular, se considera un proceso en el que los microorganismos pueden controlar y coordinar su comportamiento en función del tamaño de la población (Bassler 2002; Fuqua *et al.* 1994; Waters y Bassler 2005). Los microorganismos tienen la capacidad de emplear diferentes mecanismos para comunicarse e interactuar entre sí, con el fin de promover ciertos comportamientos (**Figura 7**). Hoy en día se han observado numerosos factores extracelulares, que se producen en función de la densidad celular (von Bodman *et al.* 2008). Esos factores, normalmente específicos de especies o cepas, son moléculas de señalización difusibles, que tienen una gran diversidad de estructuras entre los microorganismos que las producen (**Tabla 4**).



**Figura 7.** Transmisión de señales de *quorum sensing* entre agregados celulares de *L. monocytogenes*.

Existen muchos procesos, como por ejemplo la secreción de factores de virulencia, producción de antibióticos, esporulación, motilidad o formación de biofilms, que se regulan, en el caso de muchos microorganismos, a través del *quorum sensing*. Una mayor

densidad celular induce cambios en la expresión génica y éstos se relacionan, a su vez, con la activación de este tipo de procesos (Miller y Bassler 2001). Aunque por el momento se hayan realizado numerosos estudios, centrados en los aspectos moleculares del *quorum sensing*, el contexto ecológico sobre la respuesta de las señales intra e interespecies y el impacto que tiene en la calidad y seguridad de los alimentos no se han explorado exhaustivamente.

**Tabla 4.** Moléculas de señalización que se encuentran con mayor frecuencia en el *quorum sensing* bacteriano y fúngico.

Moléculas	Origen microbiano	Referencia
N-acil homoserina lactona (AHL)	<i>Proteobacteria</i>	
Oligopéptido lineal	Bacterias Gram positivas	Visick y Fuqua (2005)
Ésteres metílicos de ácido palmítico	<i>Ralstonia solanacearum</i>	
Péptido ComX CSF	<i>Bacillus subtilis</i>	Pottathil <i>et al.</i> (2008)
Ácido cis-11-metil-2-dodecanoico (DSF)	<i>Xanthomonas campestris</i> y otros	
Señal de quinolona (PQS)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hogan (2006)
Oligopéptido ciclado	<i>Staphylococcus aureus</i> y otras bacterias Gram positivas	
Dipéptidos cíclicos	Amplio rango de bacterias	Holden <i>et al.</i> (1999)
Farnesol		Hornby <i>et al.</i> (2001);
Derivados del farnesol	<i>Candida albicans</i>	Albuquerque y Casadevall (2012)
Tirosol		
Ácido trispórico	<i>Zygomycetes</i>	Wong <i>et al.</i> (2013)
a-factor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sprague y Winans (2006)

Originalmente, se creía que el *quorum sensing* era muy específico de bacterias. Sin embargo, hace más de una década que Hornby *et al.* (2001) señalaron que el farnesol actuaba como una molécula de señalización y comunicación para *Candida albicans*. Desde entonces, se han realizado diferentes estudios sobre la comunicación celular que se establece entre otras especies de hongos (Hogan 2006; Albuquerque y Casadevall, 2012). La comunicación celular, establecida entre distintas especies fúngicas, también ha sido descrita por Xavier y Bassler (2003) quienes pusieron de manifiesto que no sólo el gen que codificaba un tipo de autoinductor, llamado AI-2, estaba presente en la mitad de todos los genomas bacterianos secuenciados hasta el momento, sino que también se había

observado que el AI-2 se producía en una gran variedad de hongos y que, al mismo tiempo, se correlacionaba directamente con el control de la expresión génica. Estos hallazgos fueron los primeros en demostrar la capacidad de las diferentes especies de bacterias para comunicarse entre sí. Posteriormente, varios estudios también demostraron otras formas empleadas para la comunicación celular (Li y Tian 2012; Lade *et al.* 2014).

Aunque cada bacteria u hongo utiliza su propio sistema de *quorum sensing*, el mecanismo de funcionamiento es el mismo. Éste comprende tres pasos diferentes: i) la producción de moléculas de señalización, ii) su acumulación y finalmente iii) su detección por parte de los microorganismos que se encuentran próximos (LaSarre y Federle 2013). Por esta razón, y ahora que las estrategias para controlar el *quorum sensing* se están volviendo cada vez más relevantes, es muy importante que la caracterización de los compuestos que inhiben el *quorum sensing* se oriente, por lo menos, a uno de estos tres pasos.

Se ha observado que el *quorum sensing* tiene un papel importante como regulador de la formación, maduración y dispersión de los biofilms. Tal y como se ha mencionado anteriormente, el paso inicial para la formación de biofilms es la unión de las células planctónicas a la superficie, para convertirse en células sésiles e iniciar el desarrollo de estas estructuras. Las células que conforman los biofilms y las mismas células en forma planctónica, tienen diferencias en la expresión génica, como genes implicados en el metabolismo lipídico, producción de metabolitos, carbohidratos y transporte de aminoácidos, respuesta al estrés o con el metabolismo hierro-azufre (Nakamura *et al.* 2016). Por ejemplo, con respecto al metabolismo del hierro, la expresión de ciertos factores de adhesión, que son cruciales para la fijación celular inicial a la superficie, es inducida por una alta concentración de hierro en el ambiente (Berlanga y Guerrero 2016). Yarwood y Schlievert (2003) demostraron que, mediante *quorum sensing*, cuando *S. aureus* expresaba el gen correspondiente a la producción del péptido cíclico *Agr*, éste reprimía las adhesinas de superficie, como las fibronectinas y las proteínas de unión al fibrinógeno. En la investigación se pudo observar que la unión celular a superficies, tanto bióticas como abióticas, era más efectiva en mutantes del gen que codifica a *Agr* que cepas de tipo salvaje (Beenken *et al.* 2003; Pratten *et al.* 2001).

Para la producción coordinada de ramnolípidos, que son tensoactivos microbianos, se utilizan dos sistemas de *quorum sensing* distintos, *las* y *rhl*. Se ha demostrado que, en *P.*

*aeruginosa*, la producción de estos compuestos puede aumentar la hidrofobicidad de las células al alterar las propiedades de la superficie celular de esta bacteria, aumentando la afinidad superficial y consecuentemente la adherencia inicial a la superficie (Nickzad y Déziel 2014). Además, algunos de los componentes de la matriz extracelular del biofilm, como por ejemplo las fibras amiloides, manifiestan afinidad por las moléculas de señalización producidas y empleadas en el *quorum sensing*. De esta manera, las moléculas se quedan retenidas en la matriz llegando a encontrarse concentraciones suficientemente altas como para ser detectadas por las diferentes especies que conforman el biofilm (Seviour *et al.* 2015; Flemming *et al.* 2016). La maduración de biofilms de *Serratia liquefaciens* está influenciada por la comunicación celular. Los biofilms producidos por esta bacteria son heterogéneos y están formados por largos filamentos y agregados de células. Los mutantes en el gen *swrI*, que está involucrado en la producción de moléculas de señalización de AHL, empleado en el *quorum sensing* por esta bacteria, dieron como resultado biofilms más delgados e insuficientemente formados, que a su vez carecían de filamentos y agregados (Labbate *et al.* 2004).

La dispersión de los biofilms puede ser también regulada por el sistema de *quorum sensing*. Por ejemplo, (Solano *et al.* 2014) indicaron que en *P. aureginosa*, mediante *quorum sensing*, se estimula la expresión de una fosfatasa, que desfosforila una proteína anclada a membrana, que tiene relación con la producción de polisacáridos, lo que hace disminuir su producción y tender a la dispersión. Además, el *quorum sensing* promueve la síntesis de ramnolípidos, cuya sobreproducción puede resultar en el desprendimiento del biofilm.

Aunque en la última década el *quorum sensing* ha sido muy estudiado, el papel real que desempeña en la formación de biofilms microbianos, así como como la influencia que podría tener en el potencial patogénico para la comunidad microbiana, necesita más investigación. La respuesta a preguntas tales como cuáles son las consecuencias de interrumpir la comunicación celular entre la comunidad de microorganismos cuando están formando biofilms, proporcionará una mejor comprensión sobre cómo pueden eliminarse.

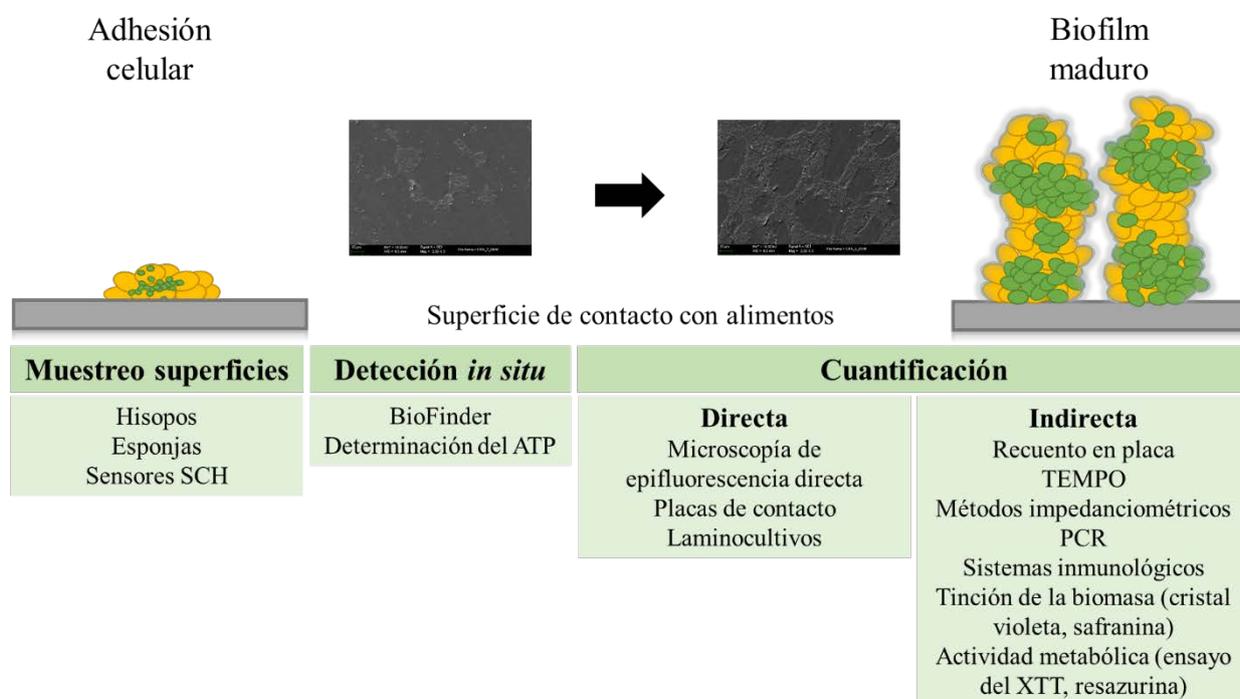
## 7.2. *Quorum sensing* y calidad de los alimentos

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios dirigidos al papel que el *quorum sensing* desencadena en la alteración de los alimentos son escasos. Normalmente, el deterioro de los alimentos es el resultado de actividades enzimáticas de diferentes microorganismos. En cualquier caso, algunas investigaciones han demostrado que el *quorum sensing* juega un papel crucial en la calidad de los alimentos, debido a que las diferentes moléculas de señalización producidas por los microorganismos son capaces de regular varias actividades enzimáticas, como la lipólisis o la proteólisis (Ammor *et al.* 2008). Esto sugiere, de nuevo, que la comunicación entre las células tiene una relevancia importante en el deterioro de los alimentos.

Gram *et al.* (2002) señalaron que algunos microorganismos, que se asocian con la descomposición de los alimentos, generalmente relacionados con la familia *Enterobacteriaceae* y otros como *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. y algunas bacterias del ácido láctico, producen moléculas de señalización para coordinar diferentes actividades enzimáticas, que están involucradas en el deterioro de los productos cárnicos y vegetales. Además, encontraron concentraciones elevadas de AHL en diferentes productos pesqueros comerciales, que se habían alterado, como el pescado picado, filetes de pescado y salmón ahumado, lo que indica el papel que desencadena el *quorum sensing* en la calidad. En otro estudio del mismo grupo de investigación, se demostró que dos cepas diferentes: *Photobacterium phosphoreum* y *Aeromonas* spp., aisladas de la microbiota de descomposición de los filetes de bacalao, podían producir AHL. Estos autoinductores están implicados en la regulación de la actividad de la quitinasa y son responsables de la degradación de los crustáceos (Flodgaard *et al.* 2005). Si se tiene en consideración la alteración de la leche y productos lácteos, Ammor *et al.* (2008) describieron cómo varias bacterias psicrotróficas proteolíticas, como *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. o *Serratia* spp., que pueden aislarse de la leche cruda o pasteurizada, han demostrado ser capaces de producir varios tipos de AHL. Esto también demuestra que, en el deterioro de este tipo de productos, el *quorum sensing* puede jugar un papel vital.

## 8. Métodos para el control de la contaminación microbiológica de superficies en la industria

El control microbiológico de las superficies de la industria alimentaria es esencial para evaluar y determinar si la población microbiana, existente o residual, está en un nivel aceptable, así como también si se han eliminado los microorganismos no deseados. Los resultados obtenidos estarán relacionados con parámetros como el estado higiénico de la superficie y, en última instancia, con la calidad final del producto alimenticio (Fung 1994). Por estas razones, se debe evaluar cuidadosamente el estado higiénico de las superficies de contacto con los alimentos. Hasta el momento, se han empleado distintas metodologías para evaluar biofilms, tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial. Sin embargo, la escasez de consenso entre los diferentes métodos empleados, para la detección y cuantificación de biofilms, dificulta la tarea de la industria alimentaria cuando se busca el método más adecuado en el entorno de trabajo. Las metodologías para la evaluación de la carga microbiana a nivel de superficie empleadas en la industria alimentaria se pueden clasificar como métodos directos o indirectos (**Figura 8**).



**Figura 8.** Resumen general de algunos de los métodos utilizados para el muestreo, detección y cuantificación de la carga microbiana en superficies de contacto con alimentos.

### **8.1. Muestreo de superficies**

Tradicionalmente, para la evaluación a nivel microbiológico de una superficie, se han utilizado métodos de muestreo como hisopos o esponjas. El empleo de estos métodos consiste en frotar sobre una superficie un hisopo de algodón estéril, normalmente sumergido en un diluyente estéril, o una esponja que suele llevar incluido neutralizante para frenar posibles efectos de biocidas que hayan quedado remanentes en la superficie. Posteriormente, las células contenidas en el hisopo o la esponja, se recuperan en una solución de extracción, mediante diferentes fuerzas mecánicas, y seguidamente son cultivados en medios de crecimiento adecuados (Ismail *et al.* 2013). Estos métodos de muestreo tienen ciertas ventajas y limitaciones. Entre las ventajas se pueden destacar su bajo coste, su elevada adaptabilidad a una gran variedad de superficies, así como también su gran disponibilidad. Sin embargo, entre sus limitaciones destacan que, tanto el hisopo como la esponja, tienden a ser ineficientes en la recogida de la muestra, ya que no consiguen recuperar todos los microorganismos en la superficie de manera efectiva cuando se encuentran adheridos en la superficie formando biofilms, o bien, pueden quedarse retenidos en el hisopo o esponja produciendo resultados erróneos (Lelieveld *et al.* 2005). De hecho, se pueden cometer errores significativos al utilizar estos métodos para la recogida de muestras. Esto se debe principalmente a la presencia de la matriz extracelular que envuelve a las células, lo que produce un alto grado de agregación entre microorganismos y su protección (Welch *et al.* 2012). Por estos motivos, es más que evidente que existe una gran variabilidad en los resultados, por lo general no son reproducibles y, al final, pueden presentar algunos problemas cuando se recolectan muestras de diferentes superficies en la industria alimentaria.

En este sentido y como ya se ha discutido anteriormente, uno de los objetivos de la industria alimentaria, con respecto a la inocuidad de los alimentos, es garantizar el control de las superficies y obtener resultados, lo más reales posible. Por eso, el desarrollo de sensores de muestreo que garanticen el análisis directo de las superficies de la industria alimentaria es de gran interés. Por esta razón, se desarrollaron unos sensores de superficie llamados sensores SCH (*Sensor Control Hygiene*), que pueden ser empleados para la monitorización de la contaminación biológica de las superficies. Éstos pueden ofrecer una alternativa a las herramientas convencionales para el muestreo de superficies. Los sensores se instalan por adhesión o soldadura a las superficies de la industria alimentaria

que se pretendan evaluar. De esta manera, permanecen expuestos, manteniéndose en las mismas condiciones que el resto de la instalación. Esto permite que la evaluación de las superficies se haga en condiciones que reflejan la realidad industrial. Como estos sensores son herramientas para el muestreo, una vez se obtiene la muestra, una parte importante del conjunto de microorganismos, adheridos a la fracción superficial, pueden encontrarse formando biofilms y podrán recuperarse. Para ello, es necesario tomar el fragmento de superficie, colocarlo en una solución de extracción y agitarlo, o bien con perlas de vidrio o por sonicación, con el objetivo de recuperar los microorganismos adheridos a la superficie (Christian *et al.* 1983; Sattar *et al.* 2001; Traoré *et al.* 2002; Gerba y Kennedy 2007; Fijan y Šostar-Turk 2010). La agitación vigorosa con perlas de vidrio permite que los microorganismos se liberen completamente, cuando están adheridos en una superficie, incluso si forman biofilms, ya que las fuerzas de fricción que se generan son muy elevadas (Lindsay y von Holy 1997). Los sensores SCH se han convertido en una alternativa simple y eficiente a los métodos tradicionales empleados para evaluar la contaminación microbiológica a nivel superficial.

## 8.2. *Detección in situ de la contaminación microbiológica de superficies*

Los métodos tradicionales empleados para la evaluación de superficies, además de tener una fiabilidad limitada, requieren por lo menos de varios días a una semana antes de obtener resultados, lo que los hacen menos apropiados como herramienta de monitorización rápida para el sistema APPCC (Maukonen *et al.* 2003). El empleo de sistemas de detección microbianos rápidos es muy importante para la gestión higiénica de la industria alimentaria, ya que, reducir el tiempo requerido para la detección de la contaminación microbiana, permite conocer el estado higiénico de la superficie, justo en ese momento, y aplicar medidas correctoras oportunas de forma inmediata (de Boer y Beumer 1999). Además, los métodos rápidos de detección *in situ* también se pueden utilizar para verificar los puntos críticos de control, justo después de la desinfección; para validar los procedimientos de higiene en las zonas de producción.

Por una parte, como método de detección *in situ* a destacar se encuentra BioFinder, que es una buena solución para detectar visualmente biofilms en la industria alimentaria en un tiempo muy corto (Ripolles-Avila *et al.* 2018). El producto está diseñado en base a la

reacción con la catalasa, un enzima presente en una gran parte de microorganismos, localizado regularmente en los biofilms. En el entorno industrial, la no detección de microorganismos sin el enzima catalasa no sería un problema, porque se ha demostrado que los biofilms están mayoritariamente formados por múltiples especies (Phillips 2016; Colagiorgi *et al.* 2017) y, entre todas ellas, habría microorganismos con actividad catalasa. La reacción positiva produce la formación de espuma blanca, en contraste con el color naranja del producto. Esto supone un cambio de color altamente visible, dando un indudable resultado positivo en condiciones de empleo industrial.

Existen, también, otros métodos que permiten la rápida detección e incluso la estimación de la cantidad de microorganismos presentes en una superficie. Uno de estos métodos es la determinación del *trifosfato de adenosina* (ATP) por bioluminiscencia, que proporciona, a tiempo real, una valoración estimada de la higiene de la superficie total (Davidson *et al.* 1999). La bioluminiscencia es la luz emitida por organismos vivos, que tienen la habilidad de producir unas enzimas denominadas luciferasas. La detección del ATP por bioluminiscencia se basa en la detección de la energía celular de los organismos vivos, siendo la cantidad de luz generada proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra, reflejando a su vez el nivel de células metabólicamente activas en un sistema (J. Chen 2003; Fung 2002). Algunos autores han descrito que su límite de detección, como en el caso de BioFinder, está entorno  $10^4$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  (Vanne *et al.* 1996; Corbitt *et al.* 2000). Sin embargo, este método no es una herramienta muy buena para muestrear biofilms, especialmente cuando éstos están maduros (Lorenzo-Cartón, Orihuel-Iranzo, Bertó-Navarro, & López-Torno, 2011). En estas situaciones, se podría obtener una baja señal de ATP, lo que indicaría una baja carga microbiana, cuando en realidad podría haber un biofilm maduro, compuesto por una alta concentración de microorganismos. Por esta razón, a nivel industrial podría ser más adecuado utilizar BioFinder, que actuaría directamente en la superficie, y revelaría la presencia de biofilms. No obstante, no hay aún estudios que correlacionen la intensidad de la reacción a Biofinder, con los niveles de ATP y el recuento de microorganismos, mediante sistemas más representativos de la contaminación de superficie, como pueden ser los SCH.

### 8.3. *Cuantificación de la contaminación microbiológica de superficies*

#### 8.3.1. Métodos directos

Los métodos directos para la cuantificación de la carga microbiana de una superficie se basan, por una parte, en la observación directa de los microorganismos adheridos a la superficie, donde se incluyen diferentes técnicas de microscopía, como la microscopía de transmisión, la microscopía confocal o la de epifluorescencia directa (Djordjevic *et al.* 2002). Por otra parte, también se pueden basar en la toma de muestras con un recuento directo, donde se incluirían las placas de contacto y los laminocultivos.

Se han utilizado varias modalidades de microscopía, tanto para detectar como para cuantificar la biomasa de los biofilms y su viabilidad celular. Esto proporciona, a su vez, información valiosa y complementaria sobre diferentes aspectos de la estructura compleja de los biofilms (Azeredo *et al.* 2017). Una de las técnicas a destacar es la microscopía de epifluorescencia directa (DEM), que se ha convertido en la técnica de microscopía ideal para examinar la adhesión celular y la posterior formación de biofilms en superficies de contacto con alimentos. Permite la detección selectiva y específica de células y moléculas en pequeñas cantidades, donde los objetos de interés fluorescen, lo que permite marcar virtualmente cualquier aspecto de los sistemas biológicos (Fontecha-Umaña 2014).

Existen determinadas moléculas, conocidas como fluoróforos o fluorocromos, que tienen la capacidad de absorber luz a una específica longitud de onda y emitirla a una longitud de onda diferente. Estas moléculas absorberán la luz a una determinada longitud de onda para promoverlas a un estado de energía superior seguido por la emisión de luz a longitud de onda más larga conocida como fluorescencia (Petty 2007). La fluorescencia ocurre cuando un electrón excitado regresa a una órbita de baja energía y emite un fotón de luz, lo que hace aparecer al componente brillante sobre un fondo oscuro (Fontecha-Umaña 2014). Se pueden utilizar diferentes tinciones fluorescentes, para evaluar la actividad celular o la viabilidad de los microorganismos. Por ejemplo, se pueden marcar las células adheridas a la superficie en estado viable y no viable, para ser cuantificadas *a posteriori*. La cuantificación de la muestra se suele hacer mediante sistemas automáticos de recuento, que se basan en un *software* específico que se utiliza para analizar las imágenes obtenidas, lo que permite procesar una gran cantidad de parámetros en poco tiempo (Maukonen *et*

al. 2003). Las imágenes analizadas pueden almacenarse en un soporte digital para ser reevaluadas o interpretadas desde otros puntos de vista, incluso por otros laboratorios. No obstante, y aunque las técnicas de microscopía son más ventajosas en el análisis y cuantificación de biofilms; por ser menos destructivas que los métodos indirectos, la laboriosa naturaleza del análisis y los costes asociados, limitan su aplicación a gran escala.

Otros métodos considerados como directos serían las placas de contacto o los laminocultivos. Éstos consisten en el empleo de una placa o lámina con agar estéril el cual se contacta con la superficie a evaluar (Mostert *et al.* 2005). La desventaja principal de esta técnica es que solo es efectivo cuando se emplea en superficies lisas, planas y con un bajo recuento, ya que no es posible hacer diluciones. Estos métodos son muy fáciles de emplear, no obstante muestran ciertos factores limitantes como por ejemplo el desprendimiento de los microorganismos adheridos a la superficie, que en muchas ocasiones no se desprenden con facilidad, sobre todo cuando se encuentran formando biofilms. Para ello, se necesitaría del empleo de fuerzas importantes para desprender las células adheridas (Salas-Vázquez 2007).

### 8.3.2. Métodos indirectos

Los métodos indirectos están basados en la separación previa de los microorganismos adheridos a la superficie, antes de contarlos. En este grupo se incluyen técnicas para determinar la viabilidad microbiana, tales como recuentos en placa convencional, el sistema TEMPO, técnicas para la determinación de la turbidez o la impedancia, pruebas inmunológicas, técnicas basadas en la amplificación molecular, tinción de la biomasa de biofilms, o pruebas basadas en el metabolismo de las células que conforman estas estructuras. Para seleccionar el método analítico se deben tener en cuenta diferentes aspectos: utilidad, ventajas y limitaciones, pero se ha observado que la combinación de los métodos garantiza una mayor eficacia de detección y cuantificación (van Houdt y Michiels 2010).

El recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), después del cultivo en placa, ha sido la manera tradicional de determinar la viabilidad bacteriana. No obstante, el recuento en placa es un proceso que lleva mucho tiempo, necesitando desde 2-3 días para

obtener resultados iniciales, hasta más de 1 semana para confirmar los microorganismos patógenos específicos. Por ello son inadecuados cuando se requieren respuestas rápidas. A fin de prevenir la propagación de ETAs, garantizar la inocuidad de los alimentos y proteger la salud pública, existe una demanda cada vez mayor de métodos rápidos. Éstos pueden ayudar a evaluar el nivel de contaminación microbiológica; así como la detección de patógenos transmitida por los alimentos. Además, éstos servirían a su vez de base para el establecimiento de medidas correctoras, oportunas dentro del sistema APPCC (Teufel y Redl 2006; Zhao *et al.* 2014).

Los métodos impedanciométricos han sido unos de los recomendados y empleados en la industria alimentaria, para evaluar el estado higiénico de las superficies en contacto con los alimentos y, por lo tanto, la presencia de biofilms (Álvarez *et al.* 2005). Este método indirecto se basa en cambios en la impedancia de un medio en el que tiene lugar el crecimiento y el metabolismo microbianos. El tiempo necesario para que estos cambios alcancen un valor umbral (tiempo de detección) son inversamente proporcionales al inóculo inicial. Estas mediciones que detectan cambios de resistencia son determinadas más fácilmente si la superficie está altamente contaminada. Si por el contrario, la superficie tiene un bajo nivel de contaminación microbiológica, se necesitarán periodos muy largos de incubación (de Boer y Beumer 1999).

Otro método indirecto utilizado, para la cuantificación del nivel de contaminación de superficies es el sistema TEMPO, validado por AFNOR (AFNOR 2005), que se basa en la automatización de la técnica del Número Más Probable (NMP). El método consiste en: i) viales, que contienen un indicador fluorescente y un medio de cultivo específico que permite el crecimiento bacteriano; ii) tarjetas, que ofrecen la precisión del método de recuento del número más probable, utilizando 16 tubos en los que la muestra se deposita para su evaluación. Cada celda corresponde a un tubo de dilución y el tamaño de cada celda corresponde de 1 a 3 niveles de dilución; iii) TEMPO Filler, que dispensará el vial que contiene la muestra con el medio de crecimiento específico a las tarjetas y posteriormente los sella para evitar posibles contaminaciones; iv) Estación TEMPO Prep, que se utiliza para codificar y asignar cada tarjeta a la muestra correspondiente. Después, se incuban, teniendo en cuenta la temperatura y el tiempo estipulados para permitir el desarrollo óptimo de los microorganismos; v) TEMPO Reader Station, que se utiliza para obtener finalmente los resultados. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las

tarjetas se llevan a la estación TEMPO Reader para su lectura. La lectura se lleva a cabo mediante unos lectores conectados a un circuito de detección óptica, de acuerdo con el número y tamaño de pocillos positivos, que son aquellos fluorescentes. El sistema TEMPO transforma estas lecturas, utilizando métodos estadísticos, para calcular la concentración de microorganismos presentes en la muestra inicial o NMP. La interpretación se realiza mediante la aplicación de un modelo matemático, definido para obtener los resultados finales estimados. Aunque este sistema necesita el mismo período de incubación que el método de recuento en placa, al ser un método automatizado, garantiza resultados rápidos, estandarizados y precisos, así como también minimiza la variabilidad del operador aumentando la uniformidad de los resultados y asegurando una trazabilidad completa (Katase y Tsumura 2011).

Un método altamente empleado para la detección de patógenos son las pruebas inmunológicas, principalmente el Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) que utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar microorganismos patógenos. Los anticuerpos que se usan son específicos a antígenos que se encuentran en estructuras superficiales, metabolitos tóxicos o células completas propias de los microorganismos a detectar. En el ELISA, estos anticuerpos identificarán sus correspondientes antígenos, cuya presencia indicará la contaminación de la muestra analizada (J. Chen 2003). A nivel comercial, se destaca el kit inmunológico Vitek Immuno Diagnostic Assay System (VIDAS) de BioMérieux (Sewell *et al.* 2003). VIDAS es un sistema basado más específicamente en la técnica Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA), que acopla la automatización con la tecnología ELISA (Gasnov *et al.* 2005). Hay que destacar que, hasta el momento, el empleo de este método no serviría para cuantificar, sino que solo podría ser específico para la detección de patógenos concretos. La ventaja de este método es que el tiempo para la obtención de resultados es más corto, en especial si se realiza una inmunoconcentración, los que se podrían llegar a obtener en un día (Keith 1997).

A finales del 1980, la hibridación del ADN fue el foco de atención para el desarrollo de métodos de enumeración cuantitativos y muy específicos, que empleaban tiempos de análisis cortos. De esta manera, la introducción de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en los diagnósticos microbiológicos ha sido propuesta por los laboratorios de investigación como una alternativa valiosa a los métodos de detección tradicionales

(Malorny *et al.* 2003). Existen diferentes tipos de PCR, entre las que destaca la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR). Esta técnica se desarrolló con la finalidad de establecer una relación directa entre la concentración de ADN diana y la cantidad de producto de la PCR generado por la amplificación, a la vez que monitoriza la reacción a medida que tiene lugar (Salas-Vázquez 2007). Hay diferentes kits comerciales que combinan la amplificación del gen diana con la detección paralela de los productos de la PCR en el mismo recipiente cerrado, permitiendo una rápida y dinámica valoración de los productos de la PCR a la vez que disminuyendo significativamente el riesgo de transportar o contaminar con ácido nucleico extraño las muestras (Uhl *et al.* 2002). La PCR se acopla con la fluorescencia, haciendo que se emita una señal fluorescente que se incrementa proporcionalmente a la cantidad de producto de PCR generado en cada ciclo de reacción sucesivo. El hecho de registrar la emisión fluorescente en cada ciclo, hace que sea posible examinar la PCR en su fase exponencial, lo que es un pre-requisito para el cálculo preciso del número de copias inicial al principio de la reacción (Klein 2002). La correlación con la cantidad inicial de la plantilla diana se realiza con el primer incremento significativo de la fluorescencia, valor que se conoce como *Threshold cycle (Ct)* o ciclo umbral. El registro de la acumulación de amplicones en tiempo real se ha podido realizar gracias al marcaje de cebadores, sondas de oligonucleótidos (*oligoprobes*) o amplicones con moléculas capaces de emitir fluorescencia (Mackay 2004). El empleo de este tipo de métodos basados en la amplificación molecular tiene una serie de ventajas e limitaciones. Por una parte, entre las ventajas destacan la alta sensibilidad y precisión, una excelente eficiencia, amplicones de tamaño reducido, riesgos mínimos de contaminación cruzada, amplio rango de cuantificación (entre 7-8 unidades logarítmicas o la posibilidad de reacciones múltiples. Por otra parte, entre las limitaciones destacan que hay un número máximo de reacciones en un mismo recipiente, que puede haber un solapamiento de los espectros de emisión de los fluoróforos en las reacciones múltiples, o que hay un incremento de resultados falsos negativos (Klein 2002).

Otro tipo de método indirecto es el que utiliza colorantes que se unen a un componente a nivel celular o estructural. Éste es más específico de biofilms. Por ejemplo, uno de los ensayos más comúnmente empleados, en placas microtiter es la prueba del cristal violeta, para la cuantificación, a nivel de laboratorio, de la biomasa producida por un microorganismo cuando genera un biofilm (Christensen *et al.* 1985). El método consiste en teñir los biofilms con cristal violeta y posteriormente solubilizar el colorante unido,

para medir su absorbancia. Se ha demostrado que proporciona una buena medida para la biomasa total del biofilm, pero el resultado puede estar ligeramente sobrevalorado, puesto que la tinción no solo tiñe las células totales, sino que también puede teñir algunos componentes que se encuentran en la matriz del biofilm (Pitts *et al.* 2003). Aunque es un método altamente empleado, la falta de protocolos estandarizados hace que la comparación de los resultados, entre estudios, sea un desafío (Stepanovi *et al.* 2007). A pesar de estos inconvenientes, el método presenta algunas ventajas, como la versatilidad, ya que puede emplearse en una amplia gama de especies bacterianas, así como un alto rendimiento para el cribado de microorganismos, ya que permite probar muchas condiciones simultáneamente (Azeredo *et al.* 2017).

Otro método interesante para la evaluación y cuantificación de la viabilidad microbiana dentro de biofilms son los ensayos metabólicos (Welch *et al.* 2012). La base de estos ensayos es la conversión de un sustrato específico, por actividad metabólica celular, en un producto coloreado, que se puede medir por espectrofotometría. Se han utilizado diferentes indicadores de la actividad metabólica, para cubrir este tipo de ensayos. Uno de ellos es el empleo de sales de tetrazolio (inoloro), que mediante la conversión de éste a formazan (coloración intensa), se puede realizar una determinación de la actividad metabólica de las células que forman el biofilm (Koban *et al.* 2012). Otro indicador, que se puede utilizar en este tipo de ensayos, es la resazurina, un colorante azul, que cuando se reduce por acción de las células metabólicamente activas dentro de los biofilms, cambia a color rosa (O'Brien *et al.* 2000).

## **9. Higienización en la industria alimentaria. Una especial mención a la industria cárnica.**

Como parte imprescindible dentro del sistema APPCC, que garantiza la inocuidad de los productos elaborados en las industrias alimentarias, se encuentran los programas de limpieza y desinfección. La higienización tiene diferentes objetivos, entre los que se destacan (Álvarez-Gurrea 2015): (i) eliminar residuos microbiológicos, químicos y físicos que contaminen un producto alimenticio y afecten negativamente a la salud del consumidor conllevando, por ejemplo, a ETAs; (ii) eliminar microorganismos que puedan provocar una alteración de las características organolépticas, así como reducir la vida útil

del producto; (iii) ayudar a mantener en condiciones correctas la maquinaria, los utensilios y las instalaciones; (iv) transmitir una imagen de higiene y orden de la industria alimentaria, tanto a clientes como a trabajadores. Esto implica una serie de operaciones, que se basan en un plan de acción, que consta de varias etapas: empleo de un producto de limpieza, un agente desinfectante posterior y, finalmente, mantener las superficies de contacto con alimentos y el entorno de trabajo, en unas condiciones higiénicas adecuadas. Para ello, la mejor elección es el secado de las instalaciones.

### **9.1. Limpieza**

La limpieza es la primera parte del programa de higienización de la industria alimentaria, y es la operación que tiene como principal objetivo el desprendimiento y la eliminación de la suciedad orgánica o inorgánica, que se encuentra adherida en las superficies, objetos y utensilios (Holah 1995). De esta manera se consigue acondicionar las superficies, para que la acción de los desinfectantes sea óptima. Otro objetivo de la limpieza debe ser romper o disolver la matriz extracelular asociada con los biofilms, para permitir la penetración posterior de desinfectantes dentro de las células microbianas (Simões *et al.* 2006).

Los programas de limpieza se definen teniendo en consideración el tipo de suciedad presente y las características de los productos alimenticios que se elaboran. Esta operación se ejecuta aplicando detergentes, que se eligen en función del tipo de producto que se procesa, el tipo de residuo que genera y las propiedades físico-químicas de las superficies a las que se va a aplicar la limpieza (Troller 1993). En especial, el hecho de conocer el tipo de suciedad a eliminar permite que se elijan los productos, sistemas y condiciones para optimizar los procesos de limpieza. Los productos de limpieza tienen que tener tres características importantes: i) poder quelante, ii) desengrasante y iii) dispersante. La primera hace referencia a la habilidad de secuestrar minerales, impidiendo que puedan cristalizar, precipitar e incrustarse en los materiales en los que se está aplicando. La segunda tiene que ver con la habilidad de emulsionar y dispersar las grasas y, la tercera, es la habilidad de poder disgregar las partículas de suciedad y poder mantenerlas en suspensión (Fontecha-Umaña 2014).

La cantidad y naturaleza del producto que se emplea como detergente, el tiempo de actuación de la solución limpiadora, la temperatura de la solución y la energía mecánica administrada durante el proceso de limpieza, son los cuatro principales factores interrelacionados que influyen, de forma directa, en la eficacia del proceso de limpieza (Círculo de Sinner). Por ejemplo, disminuir el tiempo de aplicación del detergente implica que necesariamente se tendrán que emplear temperaturas más elevadas, una mayor dosis del detergente o una mayor energía mecánica.

Los detergentes que se utilizan en la industria alimentaria se separan en tres grupos diferentes, en función del pH de aplicación. De esta manera se encuentran los detergentes ácidos, neutros y alcalinos. En la industria alimentaria, los detergentes más comúnmente empleados son los compuestos alcalinos, que suelen estar basados en hidróxidos alcalinos, acompañados por agentes tensoactivos, que son moléculas anfipáticas con una parte hidrofóbica y otra hidrofílica, capaces de formar microemulsiones, para la mejora de las propiedades de limpieza. Además, incluyen agentes secuestrantes de cationes metálicos, con el objetivo de prevenir la formación de depósitos de cal. Este tipo de detergentes son capaces de romper proteínas, gracias a la acción de los iones hidroxilo; saponifican las grasas y, a altas concentraciones, pueden llegar a tener una acción bactericida (Lelieveld *et al.* 2003). Sin embargo, cuando en la superficie hay residuos inorgánicos, como restos de óxido o incrustaciones calcáreas, lo recomendable es que se empleen detergentes ácidos. Éstos actúan como desincrustantes, favoreciendo la eliminación de depósitos minerales derivados de los alimentos, agua o reacciones entre ambos. Pueden ser minerales (ácido nítrico, fosfórico, sulfúrico, clorhídrico y sulfámico) u orgánicos (acético, cítrico, láctico, tartárico, succínico, glucónico y adípico), que a diferencia de los primeros, destacan por no ser tóxicos y poco corrosivos (Guerrero-Navarro 2017). En la industria cárnica, una acción generalizada es el empleo de este tipo de detergentes con posterioridad a la limpieza alcalina. De esta manera se pueden eliminar depósitos minerales acumulados sobre las superficies, a causa de la producción (Orihuel-Iranzo *et al.* 2012).

Es importante tener en consideración que, después de la limpieza hay que aplicar un procedimiento de desinfección, ya que sólo con la primera se tendría la capacidad de retirar un porcentaje elevado de microorganismos, pero en ningún caso eliminarlos por completo. La aplicación de tan solo una limpieza, sin una posterior desinfección, puede

llegar a agravar la situación higiénica, ya que se podrían desprender fragmentos de biofilms y, al no eliminarlos, éstos podrían adherirse de nuevo a otras superficies para empezar el ciclo de formación de estas estructuras. Por esta razón, la desinfección es una operación complementaria pero esencial para la industria alimentaria (Carpentier y Cerf 2011; Falcó *et al.* 2018; van Houdt y Michiels 2010).

## 9.2. Desinfección

La desinfección es el procedimiento, que tiene como objetivo principal, eliminar o inactivar microorganismos presentes en las superficies de trabajo. Como consecuencia, se han de alcanzar niveles de contaminación microbiológica seguros. Esto supone no representar un peligro para la salud pública o la calidad de los productos alimenticios. Por tanto, prevenir el desarrollo de microorganismos en las superficies durante el periodo de producción, debería evitar, de forma indirecta, la transferencia al producto (Holah 1995; Lelieveld *et al.* 2003; Mostert *et al.* 2005). La composición de los desinfectantes, en especial la sustancia biocida activa o combinación de varias de ellas, es uno de los principales aspectos que se tienen en consideración, cuando se va a seleccionar el desinfectante a emplear. Es importante tener en consideración que no existe un desinfectante ideal, sino que algunos funcionarán mejor o peor que otros, en función del tipo de superficie, el microorganismo predominante y dimensión de los biofilms formados; por lo que habrá que escoger el compuesto más adecuado. El hipoclorito sódico (NaHCl), el ozono (O<sub>3</sub>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y los amonios cuaternarios son los desinfectantes más empleados en las plantas de procesado de alimentos (Hernández-Puga 2016).

Hoy en día, el RD 3349/1983 es el que regula el empleo de desinfectantes en la industria cárnica. Este Real Decreto establece las obligaciones relativas al registro de productos activos y los requisitos para su autorización. En este sentido, se exige la inscripción de los desinfectantes en el Registro Oficial de Plaguicidas, gestionado por el Ministerio de Sanidad y se definen los requisitos indispensables para la autorización de los desinfectantes que se pueden utilizar en la industria alimentaria. Para que un desinfectante esté autorizado, como requisito importante, tiene que haber demostrado la capacidad biocida a través de ensayos de eficacia, basados en estándares internacionales, que son

normas que definen rigurosamente las condiciones de ensayo, así como los microorganismos con los que se tiene que evaluar la capacidad biocida. Actualmente, en España, para poder autorizar un desinfectante de superficies de contacto, tendrá que superar la norma de referencia UNE-EN 13697 (AENOR 2015), con una reducción mínima de 5 log (UFC).

### **9.3. Estrategias alternativas**

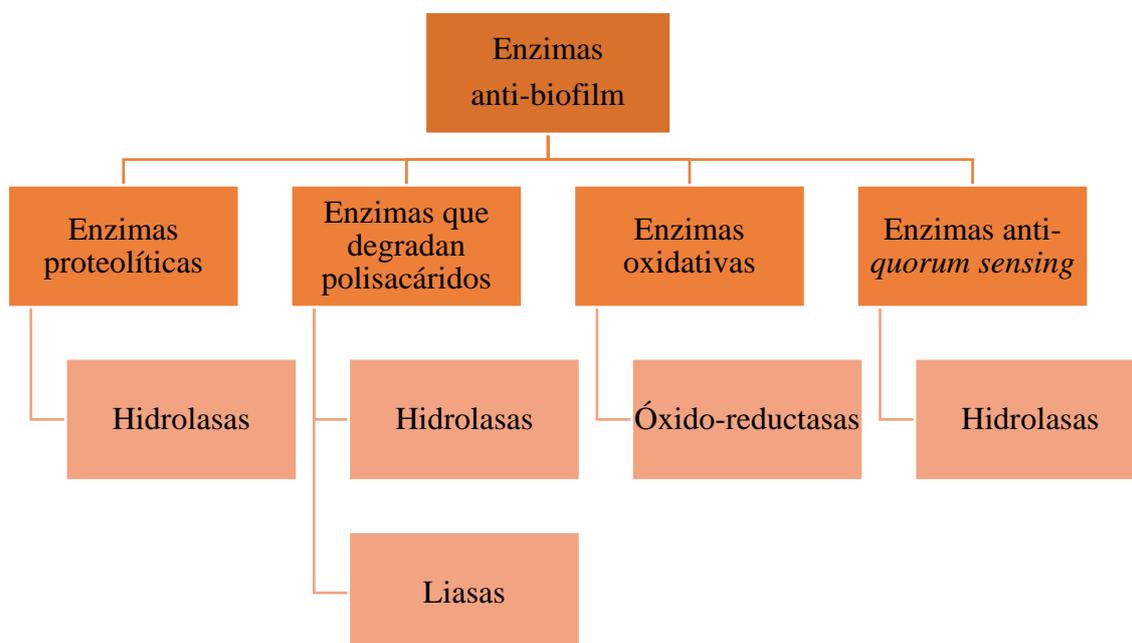
La investigación de nuevos métodos o sustancias, para la higienización de biofilms, es un área de investigación importante, lo que supondrá un nuevo enfoque. La reciente y creciente percepción negativa de los consumidores frente a las sustancias químicas sintéticas, ha empezado a desplazar la investigación en relación a estos procedimientos hacia diferentes alternativas (Chizoba-Ekezie *et al.* 2017; Fink *et al.* 2017; Raffaella *et al.* 2017; Witte *et al.* 2017; Gabriel *et al.* 2018). Algunas de ellas serán discutidas a continuación.

#### **9.3.1. Enzimas**

Desde el siglo XX, la aplicación de enzimas, como agentes limpiadores, ha ido aumentando progresivamente en los países desarrollados, introduciéndose en especial en formulaciones de detergentes empleados en la industria textil. Su aplicación en la industria alimentaria, aunque no novedosa en sí misma, está aprobada por las agencias reguladoras (Schmidt 1997; Meireles *et al.* 2016). La tecnología permite un elevado grado de personalización, para buscar protocolos adaptados a la propia industria, mejorando de forma integral y específica la limpieza. Se considera que es una tecnología limpia, que respeta el medio ambiente, pues no son tóxicas ni estables indefinidamente (Guerrero-Navarro 2017). Aquello más interesante de la tecnología enzimática, en el entorno alimentario, es que las enzimas tienen la capacidad de disgregar la matriz de los biofilms, lo que ayuda a mejorar la higiene de las superficies. La matriz extracelular, como se ha descrito anteriormente, es muy heterogénea y depende de los microorganismos que la formen. De esta manera, en función de los microorganismos predominantes de las superficies, se podrían definir estrategias de limpieza para optimizar su eficacia y personalizar los tratamientos. No obstante, es importante destacar que, en muchas ocasiones, el coste de los enzimas disponibles comercialmente es elevado, por lo que hay

que intentar disminuirlos para ser competitivos en el mercado y así generalizar su empleo. Por ello, se hace necesario optimizar su utilización, lo que se consigue ajustando las condiciones óptimas en términos de temperatura y pH. Esto permite reducir la concentración de los enzimas al mínimo, manteniendo su eficacia.

Aunque el objetivo de las enzimas está asociado normalmente con la matriz extracelular que rodea las células, su modo de acción puede variar mucho. Se ha observado que las enzimas pueden: i) atacar directamente los componentes del biofilm y degradarlos; ii) inducir la lisis celular; iii) interferir con el sistema de *quorum sensing* o iv) catalizar la formación de sustancias antimicrobianas (Thallinger *et al.* 2013; Meireles *et al.* 2016). Se ha determinado que, para que la matriz de los biofilms se degrade de forma eficaz, es necesario que se combinen diversos tipos de enzimas o asociarse con tratamientos complementarios (**Figura 9**) (Simões *et al.* 2010).



**Figura 9.** Clasificación de las enzimas relevantes para el control de biofilms en formulaciones de detergentes. Modificado de Simões *et al.* (2010) y Thallinger *et al.* (2013).

Lequette *et al.* (2010) realizó un estudio sobre la aplicación de esta tecnología para eliminar biofilms formados por diferentes especies aisladas de ambientes de procesado

de alimentos. En él, se indicó que utilizar enzimas, como agentes limpiadores, era una tecnología eficaz para la industria alimentaria, en cuanto a la eliminación de biofilms. No obstante, se observó que su acción dependía, en gran medida, de la especie formadora del biofilm, de las interacciones entre especies que lo conforman y de las condiciones ambientales. En este mismo estudio se determinó que las polisacaridasas tenían un efecto significativo, en cuanto a la desestabilización de la matriz de biofilms formados con *Pseudomonas fluorescens*. Sin embargo, las serín-proteasas tenían un efecto de despegue mayor en biofilms formados por *Bacillus* spp. Este hecho indica, de nuevo, la importancia que tiene el estudio del tipo de matriz que se genera, para así poder adaptar un tratamiento personalizado al tipo microbiota residente de cada industria alimentaria.

Actualmente, el ADNe se está convirtiendo en una molécula diana en los tratamientos enzimáticos, puesto que tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura de los biofilms. Además, interactúa con otros componentes de la matriz, en especial con los polisacáridos, por lo que se podría interferir en estas asociaciones, desestabilizar las estructuras y permitir el acceso de los biocidas (Okshevsky *et al.* 2015). Es cierto que las ADNsas tienen un coste muy elevado, lo que hace difícil plantearse su empleo generalizado en la industria alimentaria. Para conseguir un producto competitivo en el mercado, se deberían emplear algunas nucleasas de origen microbiano, que tuvieran la misma función, y así minimizar los costes.

### **9.3.2. Inhibidores de la comunicación de quorum sensing**

Tal y como se ha descrito anteriormente, los sistemas de *quorum sensing* han demostrado ser aspectos clave en la formación de biofilms, con lo que se han convertido en otra alternativa para su control. Brackman y Coenye (2015) indicaron que el bloqueo de estos sistemas puede ser realizado de 4 modos distintos: (i) inhibición de la síntesis de las moléculas señal; (ii) inhibición de la unión entre la señal y el receptor; (iii) degradación de las señales e (iv) inhibición de la cascada de traducción de la señal.

En relación al primer caso, las mutaciones en determinados genes afectan a la síntesis de señales químicas, influyendo negativamente la formación de los biofilms, haciendo que las bacterias formen estas estructuras de una forma defectuosa, inmadura y con escasa

estructuración (McCarthy *et al.* 2010; Udine *et al.* 2013). En el segundo caso, una alteración de las AHL a moléculas análogas, que interfieran en la unión directa entre las AHL y su receptor, podría tener un efecto negativo en la formación de biofilms. De esta manera, los biofilms formados por *P. aureginosa* se redujeron significativamente cuando se obtenía un análogo de las AHL, al sustituir el anillo de lactona por un anillo ciclopentil (Ishida *et al.* 2007). Aunque en este caso el análogo fue sintetizado por el hombre, existen algunos tipos en la naturaleza, en especial asociados a extractos de plantas. La tercera opción consiste en eliminar señales, cuando ya han sido producidas, impidiendo de esta manera su acumulación, técnica que se ha denominado *quorum quenching* (Oh *et al.* 2017). Existen diversas enzimas que han demostrado desencadenar una modificación de la estructura, con una consecuente pérdida de actividad con las señales de AHL, destacando entre ellas las acetilasas, lactonasas, reductasas y oxidasas. Sin embargo, no se ha observado un enzima concreto que degrade moléculas señal de *quorum sensing*. Finalmente, se puede dar un bloqueo, a nivel de cascada de activación de los sistemas de *quorum sensing*, mediante algunos compuestos; como las furanonas o el cinamaldehído. Los dos compuestos han demostrado tener capacidad de interferir con diversos sistemas de *quorum sensing*, influyendo, de forma directa, en la formación de biofilms de muchas especies diferentes, como por ejemplo *E. coli* (Brackman *et al.* 2011). No obstante, el empleo de furononas está restringido, por ser tóxico. En cambio, el cinamaldehído se utiliza mucho como aditivo saborizante en alimentos y bebidas.

### 9.3.3. Quitosano

El quitosano es un polisacárido que se obtiene por medio de la deacetilación parcial de la quitina. Tiene muchas aplicaciones y ventajas, que resultan beneficiosas para la industria alimentaria. Entre ellas hay que destacar que es biodegradable, biocompatible, económico, no tóxico y que aprovecha un subproducto de la industria alimentaria, es decir, los caparazones de los crustáceos y las conchas internas de los cefalópodos.

Entre las diferentes propiedades que posee se distinguen las antimicrobianas, que pueden actuar sobre un amplio espectro de microorganismos. Diferentes investigaciones han apuntado que su modo de acción radica en su carácter policationico. A pH ácido, los grupos amino del quitosano se encuentran protonados. En este estado, son capaces de

interaccionar con componentes cargados negativamente, como los que se encuentran en la superficie de las células microbianas. De esta forma, se produce que la permeabilidad de la membrana citoplasmática se modifique, así como también que haya pérdidas de contenido intracelular. Consecuentemente, la viabilidad celular se compromete y hay una muerte celular asociada (Helander *et al.* 2001). Hay otros estudios donde se ha observado, por una parte, que el quitosano puede entrar en la célula e interaccionar con el ADN, ARNm y producir alteraciones en cuanto a la síntesis proteica (Harish-Prashanth y Tharanathan 2007). No obstante, el efecto antimicrobiano global está relacionado, no tanto con un solo mecanismo de acción, sino con un conjunto de acciones, que pueden ocurrir a la vez en distintos puntos y con diferentes moléculas diana (Kong *et al.* 2010).

La aplicación de quitosano y sus derivados, como agentes anti-biofilm, y como una posible estrategia para su control en la industria alimentaria, está siendo sujeto de estudio en estos últimos años. Por ejemplo, Kong *et al.* (2010) evaluaron su potencial como componente para integrarlo en materiales de contacto con alimentos. Por otra parte, Jiang *et al.* (2011) lo evaluaron como material de recubrimiento. En este último estudio, durante el almacenamiento, se envolvieron con quitosano lonchas de salmón inoculadas con *L. monocytogenes* y se observó una reducción significativa en los recuentos del patógeno. Por el momento, en los estudios realizados, se han obtenido resultados positivos. Así, el efecto del quitosano como agente anti-biofilm parece ser dependiente de la especie formadora del biofilm, siendo la más susceptible *L. monocytogenes* y la más resistente *S. aureus* (Orgaz *et al.* 2011). No obstante, aun cuando hay estudios relacionados de más de 10 años, no hay productos en el mercado con esta sustancia.

**IV. Evaluación de la contaminación microbiológica de superficies mediante la implementación de sensores SCH en una planta de procesamiento de cerdo ibérico.**



## **1. Materiales y métodos**

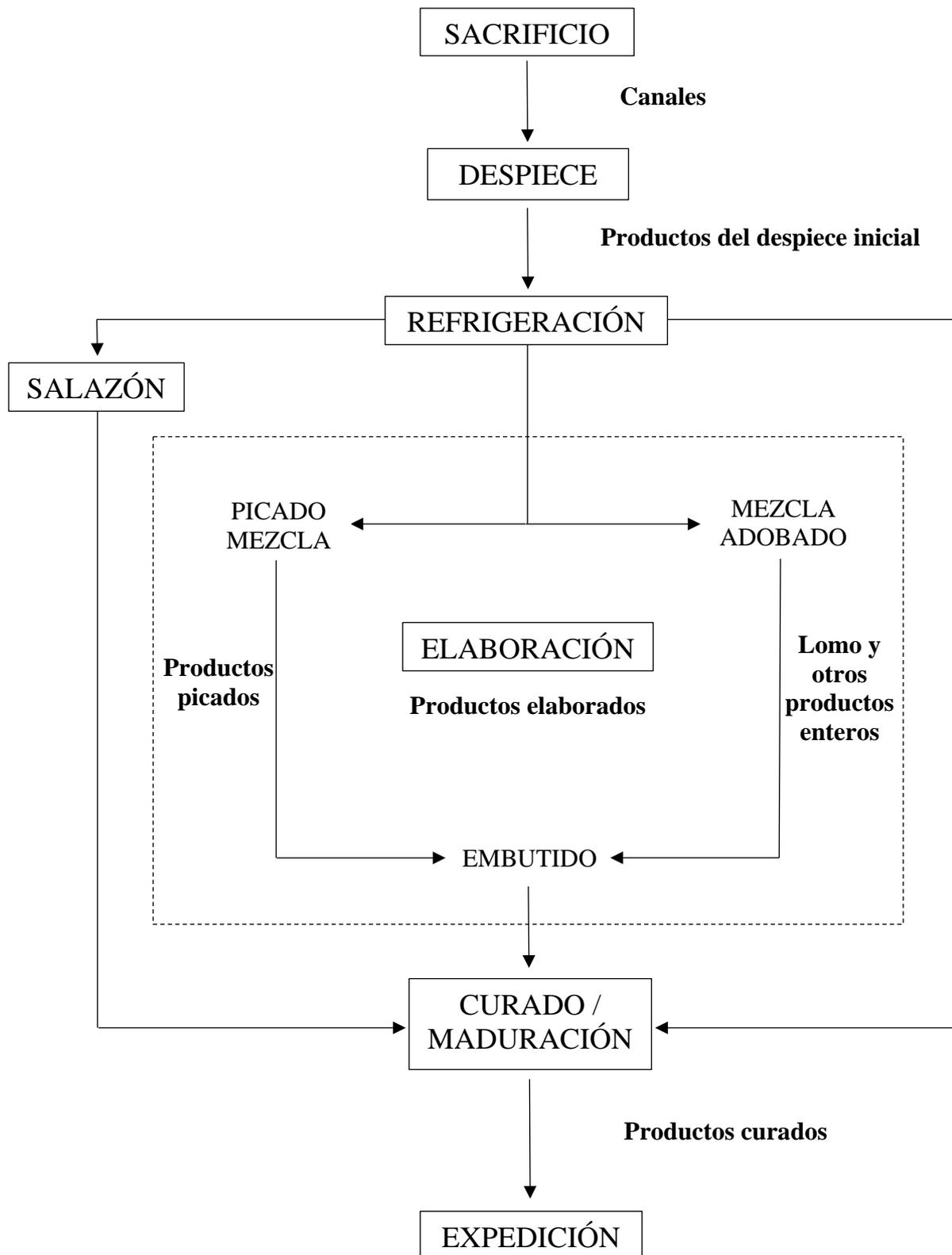
### ***1.1. Características de la planta de procesado***

El estudio se llevó a cabo en dos plantas distintas, que se denominaron A y B, de una empresa dedicada a la elaboración de productos ibéricos. Ésta, fue una de las primeras empresas españolas con matadero autorizado para exportar productos cárnicos de cerdo a EE. UU.

La planta A se dedica al loncheado y envasado de productos cárnicos crudos y productos curados listos para el consumo ('Ready to Eat', RTE) que proceden de la planta B. La planta B consta, entre sus instalaciones, de un matadero industrial de tamaño medio (con una capacidad de sacrificio de 300 animales/día), anexo a una planta de procesado donde se elaboran, principalmente, productos cárnicos curados, ya sea en piezas enteras (jamones, paletas y lomos) o embutidas como el salchichón o el chorizo. Entre estas cinco categorías, hay más de treinta productos distintos con diferentes formulaciones, tamaños, pH (desde 4,3 hasta 6,3), o incluso diferentes condiciones de maduración. El esquema general de las distintas zonas de procesado y los diferentes productos que se elaboran en esta planta industrial se representan en la **Figura 10**.

### ***1.2. Superficies de trabajo***

La idea principal fue detectar, en las plantas estudiadas, aquellas superficies que podían representar una fuente de contaminación para el producto elaborado, con el objetivo de instalar posteriormente los sensores de superficie SCH (Laboratorios Ordesa, Barcelona, España); para monitorizar el nivel de contaminación microbiana, a lo largo del tiempo.



**Figura 10.** Diagrama de las principales etapas de procesado de una de las plantas de industriales bajo estudio. Adaptado de Ortiz *et al.* (2010).

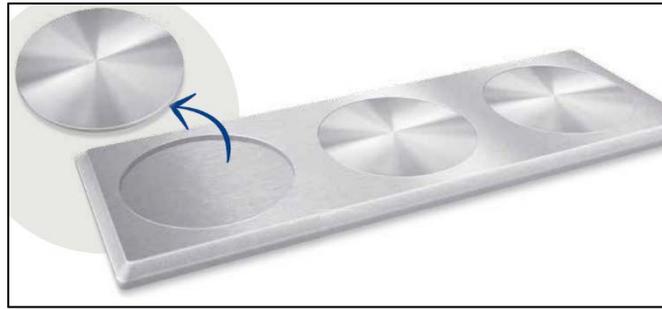
La elección de las superficies a evaluar se estableció en base a aquellos puntos de las plantas donde, en programas anteriores de muestreo, se encontró presencia de *L. monocytogenes* (**Tabla 5**). Además, para evaluar si en estos puntos había presencia de biofilms, se empleó el biodetector microbiano BioFinder (iTram Higiene, Vic, España). Este producto se basa en la detección de la actividad microbiana, gracias a la descomposición del peróxido de hidrógeno de la fórmula, por la acción de la catalasa, generando espuma blanca cuando hay una carga microbiana en superficie superior a 4 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Por lo tanto, la aparición de espuma destaca las áreas donde tiende a acumularse una mayor cantidad de microorganismos y, como consecuencia, indicó las áreas donde era más adecuado instalar los sensores SCH.

**Tabla 5.** Superficies de trabajo donde se instalaron los sensores SCH.

Planta*	Punto	Superficie
<b>A</b>	1	Sumidero sala deshuesado
	2	Mesa loncheado
	3	Sumidero sala loncheado
<b>B</b>	4	Suelo cámara oreo de canales
	5	Armario de útiles
	6	Suelo sala obrador
	7	Suelo lavadero carros de fresco
	8	Suelo lavadero carros de curado
	9	Mesa loncheado
	10	Carro de velitas
	11	Lateral envasadora vacío
	12	Suelo sala tratamiento térmico
	13	Suelo sumidero sala obrador

\* La planta A está dedicada al loncheado y envasado de productos cárnicos crudos y RTE. La planta B consta de un matadero y una sala de procesado donde elaboran productos cárnicos curados.

Estos sensores son piezas metálicas que se unen a una base de acero inoxidable, gracias a la acción de unos imanes de neodimio, recubiertos por pintura epoxi. Las bases (**Figura 11**) se fijan a las superficies establecidas como un punto a evaluar, permaneciendo en las mismas condiciones que el resto de la instalación. Por lo tanto, se ensuciarán y limpiarán de la misma manera, del mismo modo que también se contaminarán. Esto permite reproducir biofilms microbianos, formados por cepas salvajes típicas de la planta de procesado.



**Figura 11.** Diseño de un sensor SCH.

### 1.3. Plan de muestreo

La duración del estudio en ambas plantas fue de 21 meses (mayo de 2016 - enero de 2018) con un total aproximado de 980 muestras, que fueron recogidas semanalmente de las superficies donde se instalaron los sensores SCH (**Figura 12**).



**Figura 12.** Colocación de los sensores SCH con sus respectivos cupones de acero inoxidable en diferentes superficies de la planta B, siendo (a) el suelo del lavadero de los carros de fresco; (b) la mesa de loncheado; y (c) el lateral de la envasadora al vacío.

Éstos tienen tres posiciones para poder colocar tres discos de acero inoxidable AISI 316 grado 2B (2 cm de diámetro y 1 mm de espesor). Para la toma de muestra, se tomó cada uno de los discos con una barra imantada estéril y se introdujo asépticamente en un frasco estéril, volviendo a colocar un nuevo disco en el hueco liberado. Cada semana se tomaba un disco, que había permanecido en esa posición durante 3 semanas seguidas, antes de que se recogieran en el muestreo. Por tanto, todos los discos analizados estuvieron la misma cantidad de tiempo en la instalación antes de analizarse. Los frascos, conteniendo los discos, fueron enviados al laboratorio para el análisis microbiológico.

#### **1.4. Análisis microbiológico de las superficies de trabajo**

El análisis microbiológico de las diferentes superficies de trabajo se realizó para el recuento de aerobios totales, enterobacterias, coliformes/*E. coli*, *Staphylococcus* coagulasa positivo, bacterias del ácido láctico y mohos y levaduras. Además, se investigó la presencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*.

Para realizar una extracción de microorganismos adheridos en una superficie, se debe elegir un modelo que garantice una alta extracción de los mismos, para no tener lecturas falsas y poder minimizar la variabilidad de los ensayos (Fontecha-Umaña, 2014). Es por esta razón que se eligió el modelo de recuperación por agitación con perlas (ISO 13697 – UNE-EN 2015). Con este objetivo, las muestras se transfirieron a frascos estériles que contenían 3,5 g de perlas de vidrio (2 mm diámetro) y 9 ml de agua de peptona (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Los frascos se sometieron a una agitación mediante vórtex durante 1,30 minutos a una frecuencia de 40 Hz, desprendiéndose de esta manera las células adheridas a la superficie para poder posteriormente cuantificar o detectar los distintos grupos o especies microbianas.

Para el recuento, la suspensión resultante se diluyó decimalmente en agua de peptona y se transfirió a diferentes medios de cultivo. En el caso del recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales, se empleó el sistema TEMPO como método de cuantificación. Para ello, se rehidrataron los viales con 3 ml de agua destilada estéril y se añadió 1 ml de la dilución decimal correspondiente. El vial de TEMPO inoculado se agitó, para homogeneizar su contenido, y se transfirió mediante una unidad de llenado a una tarjeta

con 48 pocillos de 3 volúmenes diferentes. Durante la incubación, el crecimiento del microorganismo provoca una modificación en una señal fluorescente del medio, que es detectada por la unidad de lectura. Dependiendo del número y tamaño de los pozos positivos, el sistema calcula la cantidad de microorganismos presentes en la muestra en UFC ml<sup>-1</sup>. A partir de este resultado se hizo un posterior cálculo para obtener UFC cm<sup>-2</sup>. Para el resto de los grupos microbianos a cuantificar, se llevaron a cabo según las siguientes normas ISO 21528 parte 2, ISO 4832, ISO 6888 parte 3, ISO 15214 e ISO 21527, respectivamente para enterobacterias, coliformes/*E. coli*, *Staphylococcus coagulasa positivo*, bacterias del ácido láctico y mohos y levaduras. Todos los recuentos microbianos se expresaron en log (UFC cm<sup>-2</sup>).

Para la investigación de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* se analizaron, de acuerdo con el método ISO 6579 y el método ISO 11290 parte 2, respectivamente; donde se determina que son necesarios una serie de pasos para su pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo y posterior cultivo en medios de crecimiento específicos. En el caso de la detección de *Salmonella* spp., los frascos conteniendo la muestra con agua de peptona se cultivaron a 37 °C durante 24 horas, a continuación, se transfirieron 0,1 ml a caldo de enriquecimiento selectivo Rappaport-Vassiliadis (RVP, Oxoid, Madrid, España) incubándose a 42 °C durante 24 horas y finalmente, se realizó una siembra por agotamiento en superficie de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Oxoid, Madrid, España) y se cultivó a 37 °C durante 24 horas. En cambio, en el caso de la detección de *L. monocytogenes*, se transfirió, de las muestras iniciales, 1 ml a caldo Half Fraser (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. A continuación se transfirió 1 ml a caldo Fraser (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas más, y finalmente se realizó siembra por agotamiento en agar ALOA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) ) y se cultivó a 37 °C durante 24 horas.

### **1.5. Aislamiento de *L. monocytogenes* y tipificación**

En aquellas muestras donde se obtuvo presencia de *L. monocytogenes*, se seleccionaron aleatoriamente varias colonias y se aislaron para la posterior identificación del subtipo,

con el fin de detectar diferentes cepas de *L. monocytogenes* presentes en una misma muestra.

En todos los casos, la identificación presuntiva de *L. monocytogenes* se realizó mediante cultivo en ALOA. La confirmación de los aislados se realizó mediante pruebas bioquímicas (fermentación de la ramnosa) y por inmunoensayo VIDAS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) específico para *L. monocytogenes*.

Una vez confirmadas, las cepas se sembraron 3 veces en Agar Tripticasa de Soja (TSA, Oxoid, Madrid, España) con el objetivo de tener la cepa lo más pura posible y finalmente se liofilizaron. Los líofilos resultantes se enviaron al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid, España) para la identificación del serotipo molecular y pulsotipo. La identificación del serotipo molecular se realizó mediante PCR multiplex que separa los principales serotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) en cuatro grupos de serotipos (Doumith *et al.* 2004).

### **1.6. Análisis estadístico**

En total se realizaron muestreos durante el transcurso de 74 semanas en las 13 áreas distintas, correspondientes a las dos plantas de procesado empleadas en el estudio. Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos de recuento se expresaron en unidades logarítmicas por centímetro cuadrado. Por otra parte, los resultados para la detección de los dos patógenos se expresaron como 0 o 1 en función de su ausencia o presencia, respectivamente.

De los datos obtenidos se evaluó, por una parte, el nivel de contaminación global para la distinción de zonas, con mayor o menor grado de contaminación, realizando un estudio de clasificación por clúster jerárquico de las mismas, así como también un análisis de varianza y posterior separación de medias con la prueba Tukey B de las diferentes variables que condicionan la contaminación global. Una  $P < 0,05$  se estableció como nivel de significación.

Además, para la comparación de zonas entre el primer y segundo año de estudio se realizó una prueba T de Student. Se analizaron los diferentes puntos a nivel mensual, así como también su contribución en la presencia de *L. monocytogenes*.

## 2. Resultados y discusión

Uno de los objetivos principales, en materia de seguridad alimentaria, es conseguir estándares elevados de higienización en la industria alimentaria, para así evitar contaminaciones cruzadas y mantener la vida útil de los alimentos, protegiendo la salud de los consumidores. Se ha demostrado que las superficies de la industria alimentaria son uno de los focos principales de contaminación de productos (Srey *et al.* 2013), por lo que la continua evaluación de las mismas, para su control, es completamente relevante para la higiene de los alimentos.

### 2.1. Elección de las superficies a evaluar y el método de muestreo

La elección de las superficies a evaluar se determinó por dos vías diferentes. Por una parte, en base a resultados previos de muestreo realizados por la empresa, donde se encontraron altos niveles de contaminación y, por otra, mediante el empleo de BioFinder. Este producto consigue, mediante una reacción enzimática, desprender oxígeno gas a partir de la descomposición de peróxido de hidrógeno, presente en el biodetector. Este gas es retenido en un espesante, formando una espuma claramente visible. Este reactivo permite marcar las zonas de una superficie donde hay actividad microbiana, detectando los puntos de la instalación donde hay presencia de biofilms. Se compararon diferentes superficies en una zona determinada y en función de los resultados por ambas vías, se decidieron las superficies a evaluar. En este sentido, hubo algunas superficies en las que se dudó el lugar donde colocar el sensor, por ejemplo, el área de la sala de loncheado en la Planta A, donde los resultados previos mostraron elevados recuentos, tanto en el lateral de la loncheadora, como el sumidero de la misma sala. Fue en base a la reacción del biodetector en la superficie el factor que hizo decantarse, en este caso, por el suelo.

Se necesitan herramientas útiles para la rápida y efectiva identificación de puntos, donde la limpieza y desinfección no consiguen eliminar biofilms presentes en superficies. Éstas facilitan el control de la higiene en las instalaciones y previenen contaminaciones persistentes que puedan afectar a los alimentos (Lelieveld *et al.* 2005). La metodología para la selección de superficies de interés a evaluar, por tener presencia de microorganismos y, por consiguiente, biofilms, se basó en la detección de los mismos por

simple inspección visual, de manera que se redujeron, tanto costes, como tiempos de análisis asociados. Existe otro producto basado en esta misma metodología, el TBF 300 (Betelgeux, Valencia, España), pero a diferencia del producto empleado en el estudio, se basa en el uso de agentes capaces de teñir la matriz extracelular, así como en la ausencia de coloración en presencia de residuos habituales en las industrias alimentarias, especialmente grasa o proteínas (Orihuel *et al.* 2014). No obstante, éste último no es sencillo de limpiar después de su uso, dejando manchada la superficie, a diferencia de Biofinder que, al ser hidrosoluble, se limpia fácilmente con agua sin dejar manchas o residuos.

Los sensores SCH se instalaron de forma fija en las áreas establecidas como puntos de muestreo. La exposición de los sensores, de manera integrada, en la instalación conllevó una serie de ventajas con respecto a otras metodologías de muestreo, que se aplican en la industria alimentaria. Éstos permitieron evaluar las superficies después de ser sometidas a condiciones reales, como la contaminación del proceso ambiental o la higienización *in situ* (Montañez-Izquiero *et al.* 2012). A diferencia del resto de métodos de análisis de superficies, basados en la toma de muestras con resultados estimativos, la fijación del sensor a la superficie permitió realizar un análisis idéntico al de la propia superficie, por lo que no se trataría de una estimación, sino de una medida real.

La elección del método de muestreo debe ser adecuada para la evaluación de la superficie de trabajo. En materiales no porosos, como algunos plásticos o el acero inoxidable, el empleo de hisopos y esponjas para muestrear serían adecuados, tal y como se ha descrito para *L. monocytogenes* (Krysinski *et al.* 1992). No obstante, dos décadas después, Ismaíl *et al.* (2013) destacaron que el empleo de estos métodos de muestreo presenta un gran inconveniente asociado, como es la baja tasa de recuperación y la escasa reproducibilidad. En este sentido, Moore y Griffith (2002) indicaron, que la recuperación de *Salmonella* spp., inoculada sobre una superficie seca con 3 log (UFC cm<sup>-2</sup>), fue de entre el 80-90 % en el caso de muestrear con hisopo de algodón, 15 % en el caso de muestrear con hisopo de dacron, y un 85 % cuando se muestreó mediante esponjas. Fontecha-Umaña (2014) demostró, que en discos de acero inoxidable, el muestreo con hisopos y la recuperación posterior de células adheridas presentaron el recuento medio más bajo y la mayor variabilidad en los resultados, en comparación con otras metodologías. En el estudio se indicó que los microorganismos que tienden a estar adheridos a la superficie no son

arrastrados efectivamente, y aquellos que sí han estado arrastrados, podrían quedarse atrapados entre las fibras del hisopo, reteniendo así una gran cantidad de microorganismos. Por otra parte, si de estos mismos discos de acero inoxidable se recuperan directamente, por agitación con perlas, la vibración hace que las perlas choquen contra la superficie, causando fricción y consecuentemente, los microorganismos se desprenden, derivando en un recuento real de la carga microbiana, así como también una alta reproducibilidad (Montañez-Izquierdo 2013).

## 2.2. *Estudio global de la contaminación microbiológica de los distintos puntos de muestreo*

Con el objetivo de evaluar el nivel de contaminación de superficies industriales, así como el posible desarrollo de biofilms por cepas salvajes propias de las plantas de procesado, los sensores SCH se colocaron en diferentes superficies y permanecieron durante el mismo tiempo en las instalaciones. De esta forma, tal y como se ha discutido anteriormente, los discos que posteriormente se evalúan representarán un reflejo real de las superficies normales de trabajo.

En total, fueron evaluadas 13 superficies industriales, correspondientes a dos plantas de procesado, por distintos parámetros microbiológicos. El nivel de contaminación promedio de las 74 semanas de estudio, para el recuento de aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulasa positivo, bacterias del ácido láctico y mohos y levaduras, así como también la detección de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, por las diferentes áreas analizadas, se muestra en la **Tabla 6**. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre las áreas industriales muestreadas y los recuentos obtenidos en las mismas, para los diferentes grupos microbianos, excepto para los recuentos de enterobacterias, *E. coli* y *Staphylococcus* coagulasa positivo ( $P = 0,063$ ;  $P = 0,080$ ;  $P = 0,989$ , respectivamente) entre zonas.

**Tabla 6.** Media global de los recuentos obtenidos en las distintas áreas donde se instalaron los sensores SCH como método de muestreo a lo largo de las 74 semanas de estudio en dos plantas de procesamiento de cerdo ibérico (Planta A y B). Los datos representan la media en log (UFC cm<sup>-2</sup>) ± el error estándar.

Planta	Área	Recuento log (UFC cm <sup>-2</sup> )							Detección (ausencia/presencia)	
		Aerobios mesófilos	Enterobacterias	Coliformes	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Lácticas	Mohos y levaduras	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
A	Sumidero sala deshuesado	1,97±0,19 <sup>bcd</sup>	0,25±0,08 <sup>a</sup>	0,21±0,08 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,27±0,23 <sup>abc</sup>	1,23±0,32 <sup>a</sup>	0	0
	Mesa loncheado	2,07±0,19 <sup>bcd</sup>	0,11±0,08 <sup>a</sup>	0,11±0,11 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,49±0,28 <sup>bc</sup>	1,67±0,29 <sup>abc</sup>	0	0
	Sumidero sala loncheado	1,72±0,20 <sup>abcd</sup>	0,03±0,02 <sup>a</sup>	0,10±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,00 <sup>a</sup>	1,15±0,04 <sup>abc</sup>	1,17±0,20 <sup>a</sup>	0	0
B	Suelo cámara oreo de canales	3,14±0,39 <sup>ef</sup>	0,13±0,05 <sup>a</sup>	0,21±0,10 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,45±0,27 <sup>abc</sup>	2,71±0,37 <sup>cd</sup>	0	0
	Armario de útiles	2,48±0,28 <sup>cdef</sup>	0,13±0,09 <sup>a</sup>	0,23±0,11 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,04 <sup>a</sup>	1,45±0,17 <sup>abc</sup>	2,45±0,25 <sup>bcd</sup>	0	1
	Suelo sala obrador	2,41±0,22 <sup>cde</sup>	0,26±0,14 <sup>a</sup>	0,34±0,18 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,92±0,10 <sup>abc</sup>	1,70±0,29 <sup>abc</sup>	0	0
	Suelo lavadero carros de fresco	3,58±0,31 <sup>f</sup>	0,48±0,13 <sup>a</sup>	0,55±0,13 <sup>ab</sup>	0,07±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,89±0,17 <sup>cd</sup>	3,28±0,25 <sup>c</sup>	0	0
	Suelo lavadero carros de curado	2,70±0,32 <sup>def</sup>	0,52±0,16 <sup>a</sup>	0,71±0,21 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	2,63±0,36 <sup>d</sup>	3,12±0,27 <sup>c</sup>	0	2
	Mesa loncheado	1,13±0,16 <sup>ab</sup>	0,07±0,04 <sup>a</sup>	0,03±0,03 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,04 <sup>a</sup>	0,69±0,15 <sup>ab</sup>	0,67±0,22 <sup>a</sup>	0	0
	Carro de velitas	1,47±0,34 <sup>abc</sup>	0,08±0,05 <sup>a</sup>	0,07±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,04 <sup>a</sup>	0,87±0,24 <sup>ab</sup>	0,96±0,27 <sup>a</sup>	0	1
	Lateral envasadora vacío	0,63±0,12 <sup>a</sup>	0,02±0,02 <sup>a</sup>	0,04±0,04 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,03 <sup>a</sup>	0,49±0,12 <sup>a</sup>	0,71±0,16 <sup>a</sup>	0	0
	Suelo sala tratamiento térmico	1,44±0,18 <sup>abc</sup>	0,31±0,13 <sup>a</sup>	0,42±0,14 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,10±0,17 <sup>abc</sup>	1,82±0,26 <sup>abc</sup>	0	0
	Suelo sumidero sala obrador	1,74±0,39 <sup>abcd</sup>	0,36±0,22 <sup>a</sup>	0,39±0,27 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,77±0,11 <sup>ab</sup>	1,51±0,32 <sup>ab</sup>	0	0

<sup>a-f</sup> Las medias dentro de una columna que carecen de un superíndice común, difieren significativamente ( $P < 0,05$ )

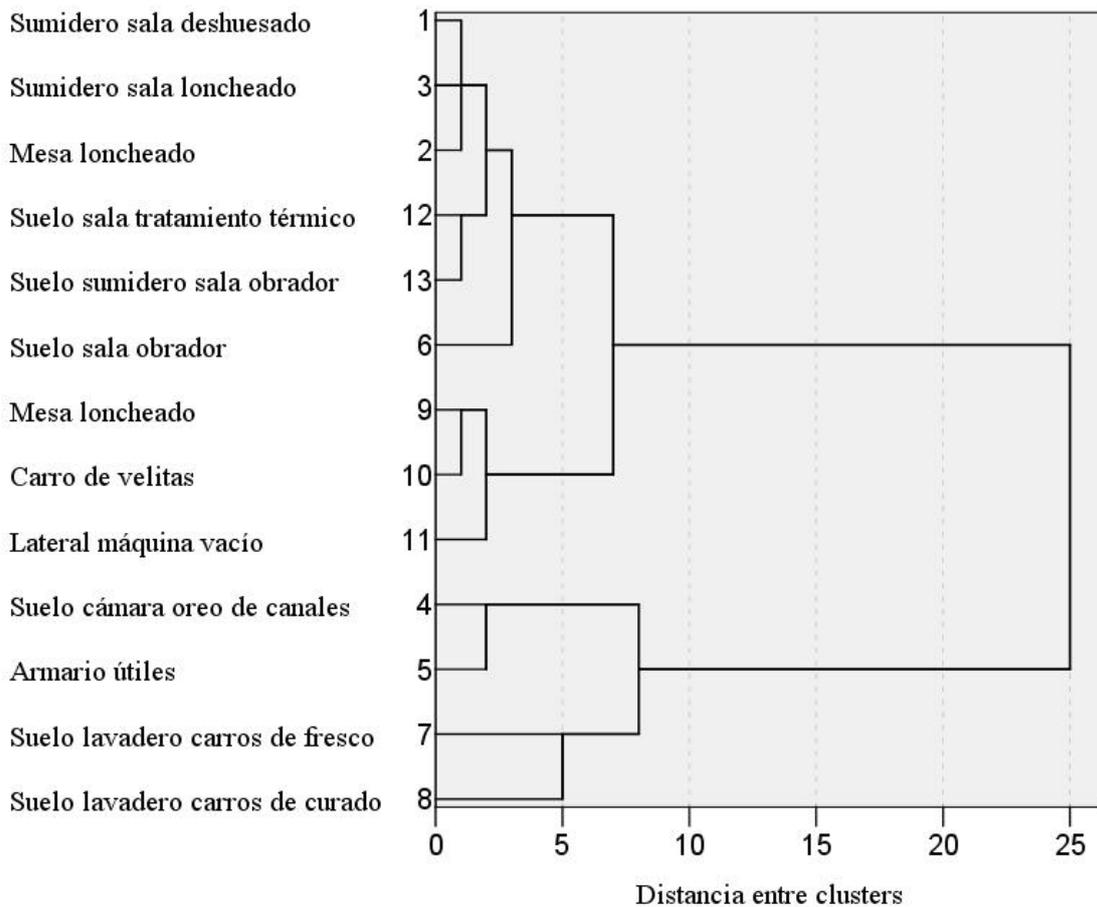
El hecho de que las áreas bajo estudio no presenten diferencias significativas en los recuentos por enterobacterias, pero, sin embargo, sí presenten diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los recuentos de coliformes, indica que hay puntos donde es más sencillo que se produzca una contaminación fecal. Estos puntos están relacionados entre sí, pues en todos ellos el sensor se instaló, o bien en el suelo, en uno de los sumideros o en el armario donde se almacenan los útiles, por lo que hay un alto grado de movimiento por parte de los operarios de la planta.

Álvarez-Gurrea (2015), en su estudio sobre la evolución de la contaminación microbiológica de superficies de la industria cárnica, indicó que el mayor grado de contaminación, durante los procesos productivos, se encontraba en zonas con una alta carga de trabajo y un alto grado de paso, pues al haber una constante actividad, hace que sea más sencillo que haya un mayor volumen de carga microbiana. Por consiguiente, un adecuado control, así como la aplicación de medidas higiénicas efectivas, puede hacer que las zonas representen el mismo nivel de contaminación y no haya puntos que sean potenciales reservorios.

Con la finalidad de clasificar al conjunto de las áreas muestreadas en grupos homogéneos, que permitan la distinción de zonas con mayor y menor grado de contaminación, se realizó un estudio de clasificación por clústeres jerárquicos, del total de contaminación obtenida por punto. Es decir, incluyendo en cada punto el recuento de los diferentes análisis microbiológicos (**Figura 13**). Los resultados muestran dos conglomerados diferenciados, por una parte, el que agrupa las cuatro zonas correspondientes a los suelos, tanto del lavadero de carros de carne fresca, como al de curada, al armario de útiles y al suelo de la cámara de oreo de canales, que fueron consideradas como áreas con un mayor nivel de contaminación ya que representaron los recuentos más elevados. Además, éstas han sido separadas en un clúster, porque difieren del resto de zonas, lo que a su vez coincide con el análisis de varianza obtenido anteriormente entre las áreas muestreadas. Los análisis microbiológicos indicaron, que estas cuatro zonas, no presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre ellas, agrupándose como mínimo en un subconjunto de valores.

Por otra parte, el otro conglomerado, considerado como las zonas que menor grado de contaminación microbiológica representan, incluye el resto de áreas de muestreo. A su

vez, se puede observar como hay dos distintas asociaciones de zonas que acaban convergiendo en un conglomerado mayor. Cabe destacar que en una de las asociaciones se incluyen las áreas tales como la mesa loncheado de la planta B, el carro de transporte de velitas y el lateral de la máquina de vacío, que por lo general son aquéllas que han dado un nivel de recuento más bajo.

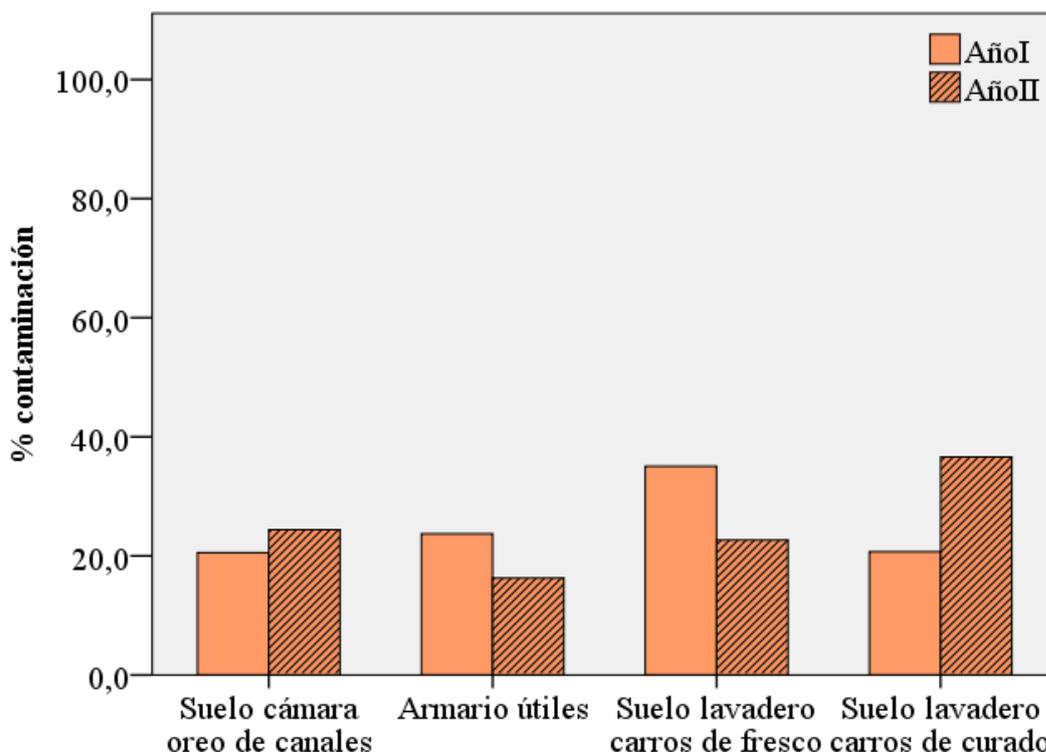


**Figura 13.** Recombinación entre las diferentes áreas de muestreo y su posterior asignación en clústeres por similitud basadas en el nivel total de contaminación por punto.

### 2.2.1. Zonas con mayor grado de contaminación

Las zonas previamente clasificadas como áreas con mayor grado de contaminación, correspondieron a los suelos, tanto del lavadero de carros de carne fresca como al de carne curada, al armario de útiles y al suelo de la cámara de oreo de canales. Los resultados

microbiológicos fueron comparados entre sí, para determinar qué porcentaje de contaminación representaban entre los dos años de estudio (**Figura 14**).



**Figura 14.** Comparación entre el porcentaje de contaminación microbiológica total que representan los puntos con mayor contaminación por año de estudio.

Del año I, que comprendió desde mayo de 2016 a abril de 2017, al año II, que comprendió desde mayo de 2017 a enero de 2018, hubo un incremento del total de los recuentos de un 14,71 %, atribuido a la mayor contaminación del suelo del lavadero de los carros de curado y al de la cámara de oreo, así como a la disminución importante en el suelo del lavadero de los carros de fresco.

En el segundo año de estudio, el nivel de contaminación microbiológica en el suelo del lavadero de los carros de curado aumentó un 12,19 % respecto al primer año, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los recuentos entre años ( $P = 0,247$ ). Este aumento podría estar asociado a que, cerca de la mitad del estudio, la base del sensor se despegó del lugar de anclaje, pues la soldadura no se había efectuado de forma correcta, y se decidió posicionarlo en el suelo en vez de la pared, tal y como se

había estipulado en un principio. Por consiguiente, el nivel de contaminación en esta zona empieza a incrementarse, dando lugar a recuentos más elevados.

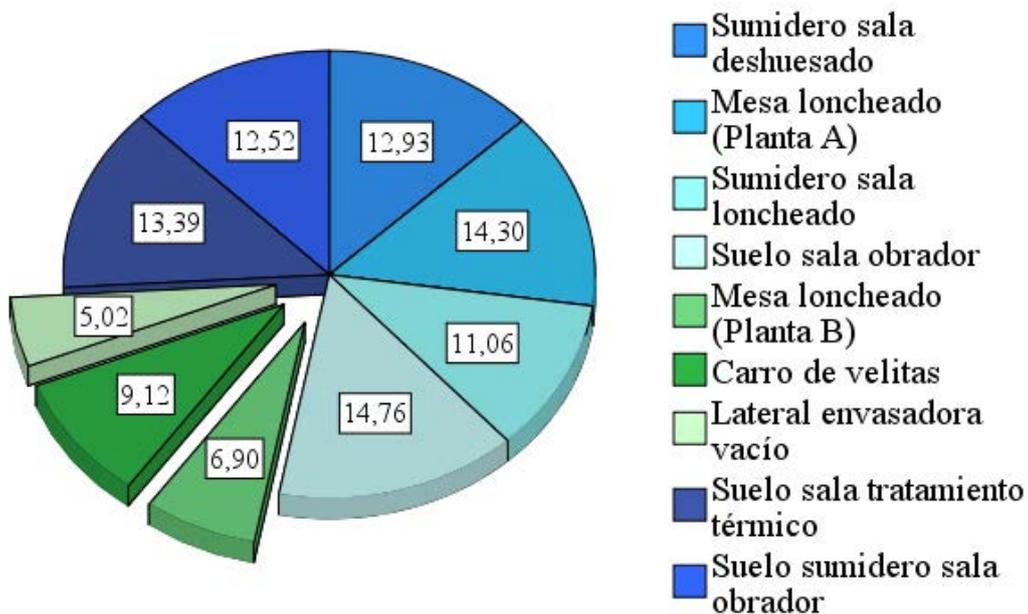
Eisel *et al.* (1997) evaluaron la carga microbiana de aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli* de varias superficies de contacto con alimentos, equipos, paredes y suelos, determinando que las paredes y los suelos representaron ser las superficies más contaminadas. Los suelos son una importante fuente de contaminación, ya que los microorganismos residentes se pueden transferir a las diferentes zonas de una industria, mediante el calzado de los trabajadores, los cuales circulan dentro del establecimiento diseminándolos. De hecho, Barros *et al.* (2007) indicaron, que las cajas de almacenamiento de producto fresco, eran uno de los puntos con una mayor contaminación de aerobios mesófilos y coliformes totales y observaron, que estas mismas, habían estado en contacto directo con el suelo previamente, ya fuera el suelo de la propia industria, el de las cámaras de refrigeración o el de las salas de ventas al por menor. Los desagües y los suelos pueden ofrecer un entorno favorable para el crecimiento microbiano y, en consecuencia, ser un importante reservorio, tal y como se ha demostrado para *Pseudomonas spp.* y *Aeromonas spp.* (Hood y Zottola 1997), *Salmonella spp.* (Rivera-Betancourt *et al.* 2004) o para *L. monocytogenes* (Ciccio *et al.* 2012). Los suelos pueden ser una fuente directa de propagación, especialmente si la limpieza se realiza con agua a alta presión. Esta práctica puede diseminar la contaminación, al suspender microorganismos en el aire en gotas pequeñas de agua (Barros *et al.* 2007).

### **2.2.2. Zonas con menor grado de contaminación**

Del total de zonas clasificadas como áreas con un menor grado de contaminación, por orden descendente, correspondieron a las siguientes zonas: suelo sala obrador (14,76 %), mesa loncheado de la planta A (14,30 %), suelo sala tratamiento térmico (13,39 %), sumidero sala deshuesado (12,93 %), suelo sumidero sala obrador (12,52 %), sumidero sala loncheado (11,06 %), carro de velitas (9,12 %), mesa loncheado de la planta B (6,90 %) y finalmente, lateral envasadora al vacío (5,02 %) (**Figura 15**).

Por una parte, los datos coinciden con lo expuesto anteriormente y es que, en el análisis de clústeres, se destacó que, aunque todas estas zonas pertenecían al mismo clúster, se

podía intuir un pequeño conglomerado compuesto por la mesa de loncheado (Planta B), el carro de transporte de velitas y el lateral de la envasadora al vacío, que fueron las zonas con un menor recuento obtenido, no llegando a suponer, en ningún caso, una contaminación microbiológica superior al 10 %. Es por esta razón que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,487$ ) en el recuento global de la carga microbiana encontrada en estos nueve puntos.



**Figura 15.** Gráfico circular del porcentaje de contaminación microbiológica total que representan, entre ellas, las zonas consideradas de menor contaminación.

Destacar, además, que las zonas que tuvieron un porcentaje más elevado de contaminación microbiológica, excepto para uno de los puntos, fueron aquellos en que los sensores estaban posicionados en el suelo, demostrando de nuevo que la carga microbiológica en estas zonas debe estar controlada, para evitar el desarrollo de potenciales reservorios, en concordancia con lo que previamente ha sido sugerido por otros autores (Mettler y Carpentier 1997; Todd *et al.* 2010). El punto considerado como la excepción, porque no está localizado en el suelo, fue la mesa de loncheado de la planta A, y su carga microbiana se podría atribuir al gran volumen de trabajo y constante actividad.

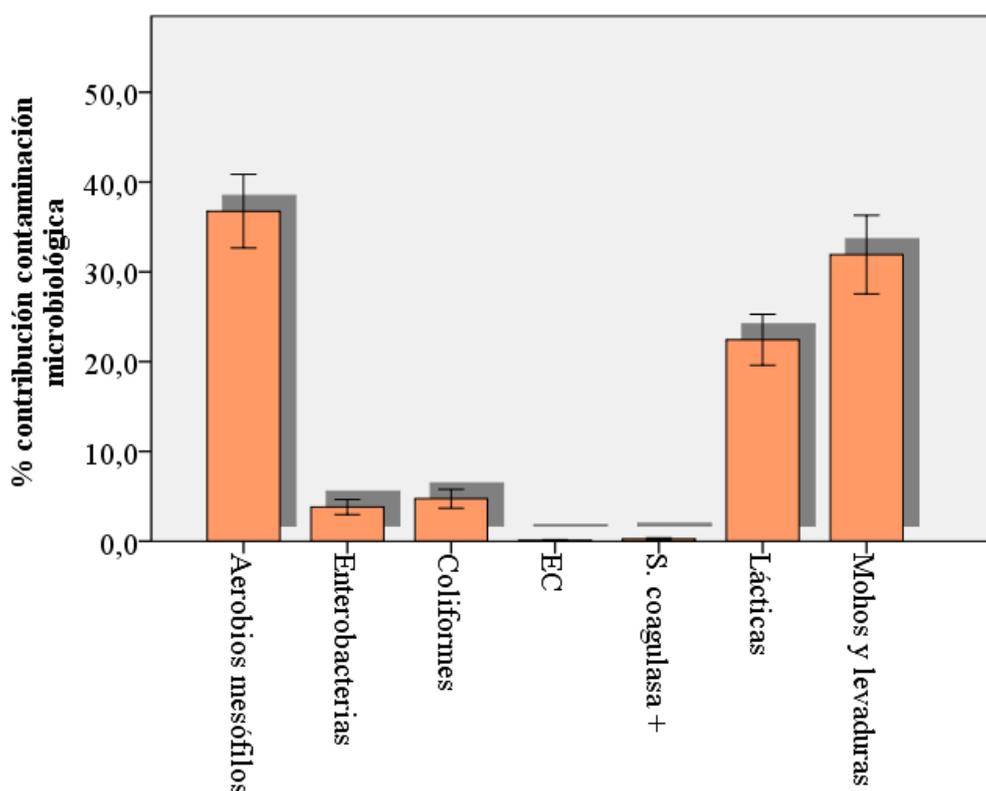
De entre todas las zonas muestreadas, las únicas cuatro superficies que se podrían considerar de contacto alimentario directo, serían la mesa de loncheado, el carro de velitas, la mesa de loncheado (Planta B) y el lateral envasadora al vacío. Actualmente, no existen normas microbiológicas de obligado cumplimiento para el control microbiano en superficies de contacto alimentario, a excepción de la Decisión 2001/471/CE por la que se establecen normas para los controles regulares de la higiene realizados por los explotadores de establecimientos de carnes frescas. En ésta se indica que aquellas superficies que superen valores de 10 UFC cm<sup>-2</sup>, para aerobios mesófilos, y de 1 UFC cm<sup>-2</sup>, para enterobacterias, se considerarán sucias. En el caso de los recuentos obtenidos de aerobios mesófilos y, según este criterio, las cuatro zonas a excepción del lateral de la envasadora al vacío, se deberían considerar como sucias, ya que superan el valor máximo fijado. En el caso de los recuentos obtenidos de enterobacterias y, según este criterio, todas las superficies se deberían considerar sucias. Cabe mencionar que en la actualidad esta decisión está derogada, así que tan solo serviría como una orientación.

Diversos autores han establecido otros límites microbiológicos para superficies considerados como aceptables. Davidson *et al.* (1999) sugirieron que un recuento de aerobios inferior a 100 UFC cm<sup>-2</sup>, en una superficie higienizada, se podría considerar un límite aceptable. Miettinen *et al.* (2001), sin embargo, consideraron que una superficie, para ser satisfactoria, debe tener un recuento de aerobios mesófilos menor a 1,8 log (UFC cm<sup>-2</sup>), un recuento moderado o aceptable entre 1,8-5 log (UFC cm<sup>-2</sup>) y un recuento insatisfactorio superior a 5 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Por tanto, no hay un consenso en los límites y los valores son extraordinariamente variables.

### **2.2.3. Agentes microbianos mayormente implicados**

Los grupos microbianos con un mayor recuento global y, por lo tanto, mayor porcentaje de contribución en el grado de contaminación microbiológica, fueron los microorganismos aerobios mesófilos, bacterias del ácido láctico y, mohos y levaduras; en un 36,76 %, 22,43 % y 31,93 %, respectivamente (**Figura 16**). No hay muchos estudios sobre determinación de aerobios mesófilos residenciales en las superficies de la industria alimentaria, en especial estudios que se enfoquen a aislamientos de estas bacterias en entornos de producción de alimentos. Por tanto, no se dispone de información tan extensa

en referencia a las características de crecimiento y su supervivencia en estos entornos, probablemente porque dichas bacterias tienen una menor relevancia para la seguridad y calidad de los alimentos que *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., o bacterias del ácido láctico (Mørretrø y Langsrud 2017).



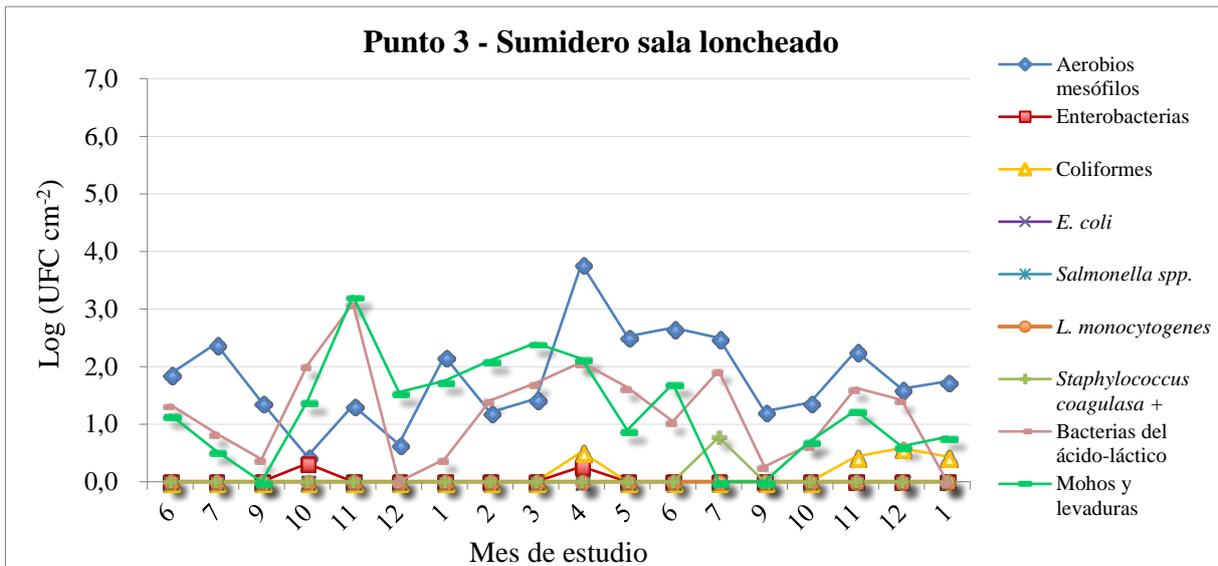
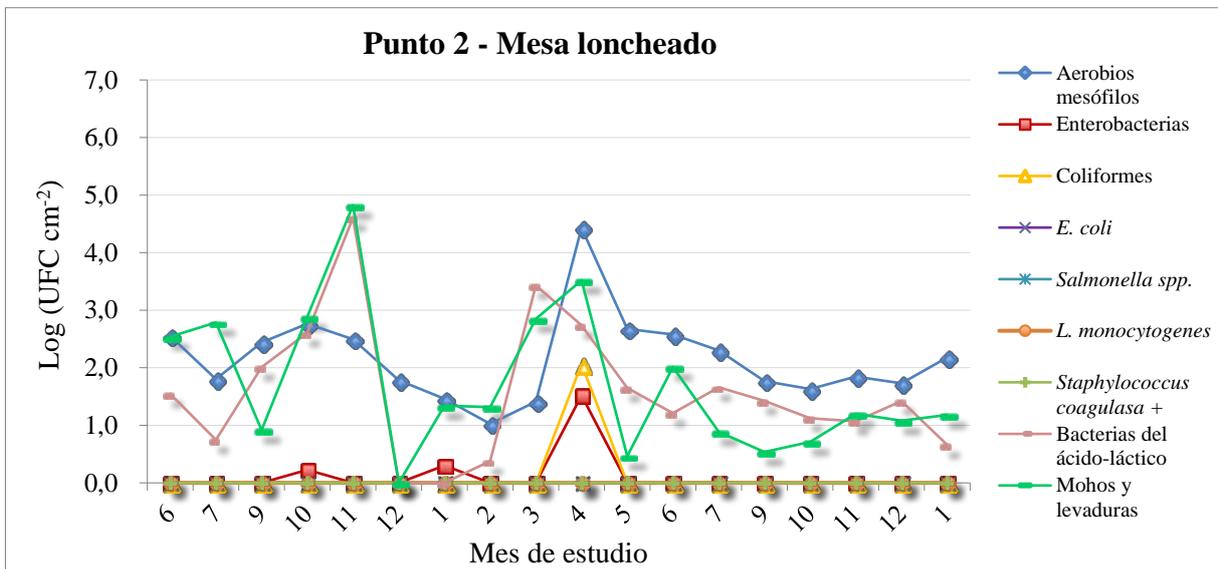
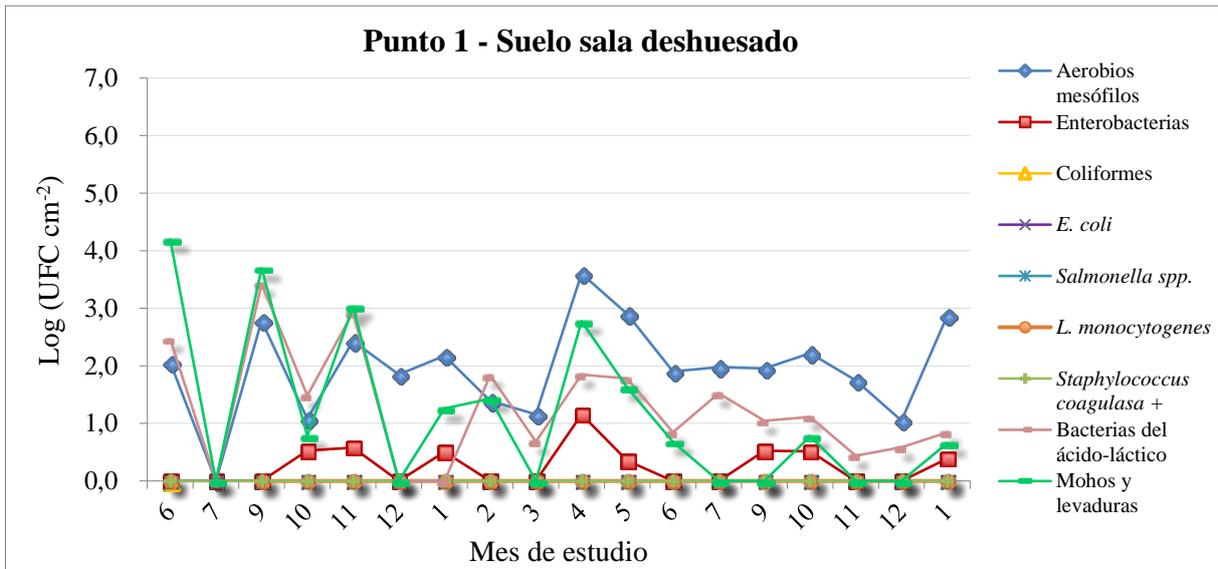
**Figura 16.** Porcentaje medio de contribución a la contaminación microbiológica por los diferentes grupos microbianos a lo largo de todo el estudio (EC para *E. coli*; S. coagulasa + para *Staphylococcus coagulasa* positivo). Las barras de error representan el error estándar de la media.

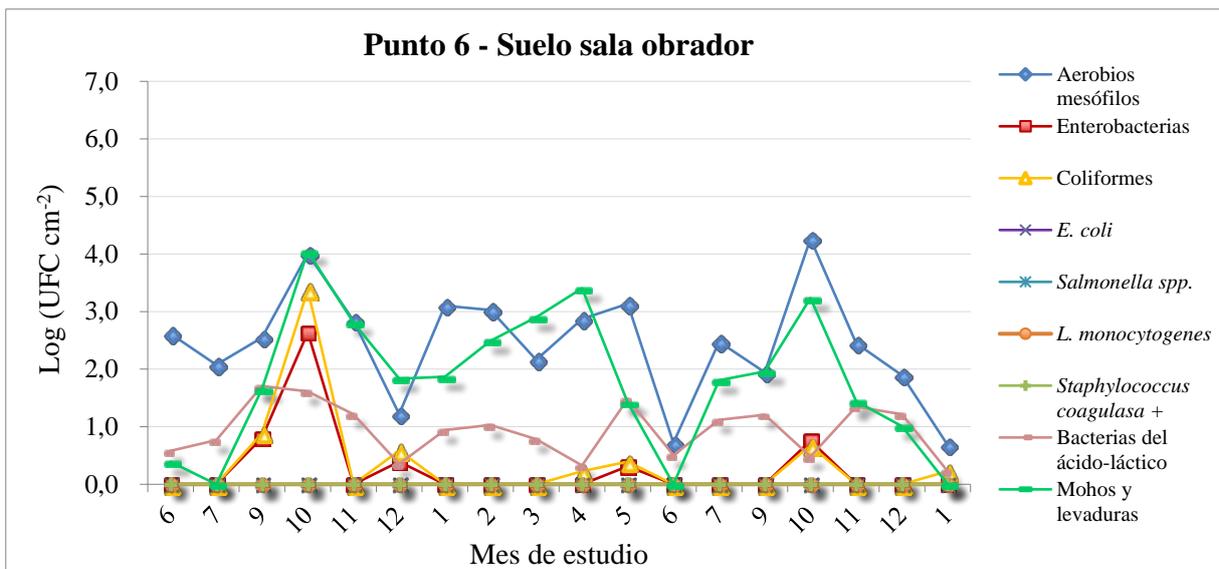
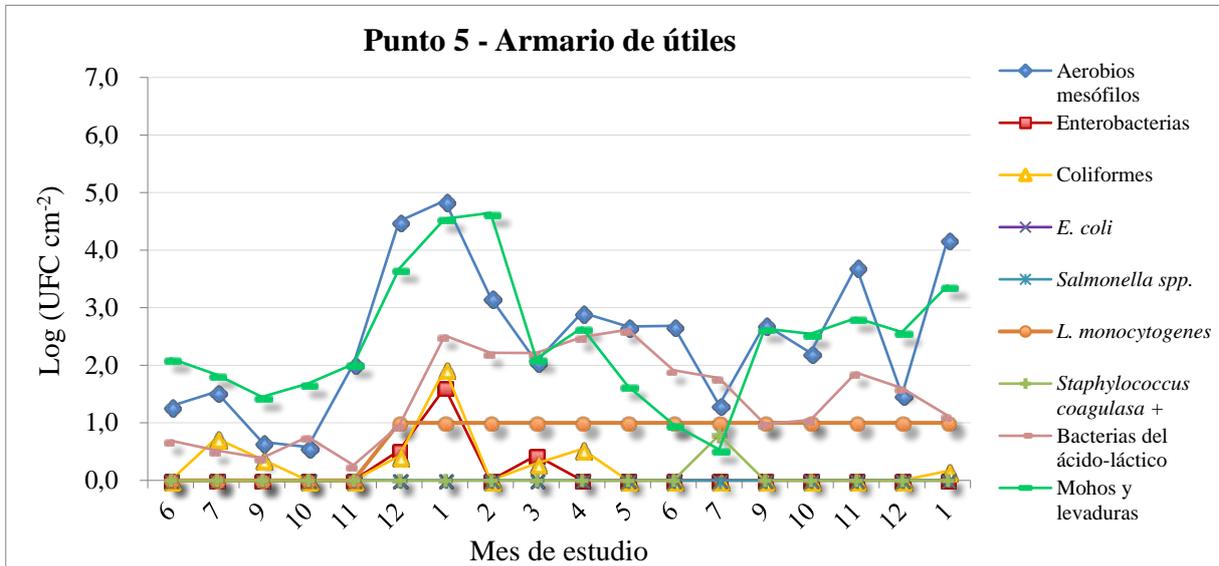
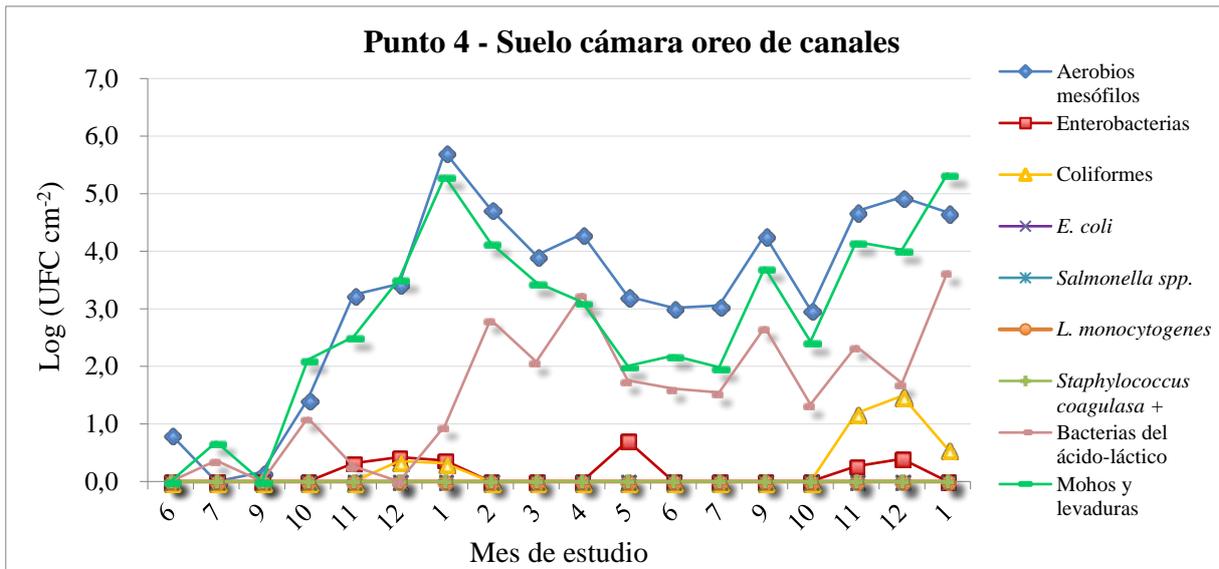
El aislamiento de diferentes grupos microbianos dominantes, en superficies de la industria cárnica, ha revelado la existencia de una gran heterogeneidad y disparidad en los resultados, dependiente de la industria. Algunos autores han determinado que, después de la limpieza y desinfección, en entornos de procesado cárnico, queda remanente como microbiota residencial *Pseudomonas* spp., en un 84 %, *Microbacterium* spp., en un 11 % o enterobacterias, como *Serratia* spp., en un 4 % (Brightwell *et al.* 2006; Gounadaki *et al.* 2008). Estos mismos autores indicaron, que la mayoría de zonas muestreadas, estaban altamente contaminados por microbiota alterante, como *Pseudomonas* spp. o enterobacterias, siendo las superficies más contaminadas las cuchillas, las mesas y las

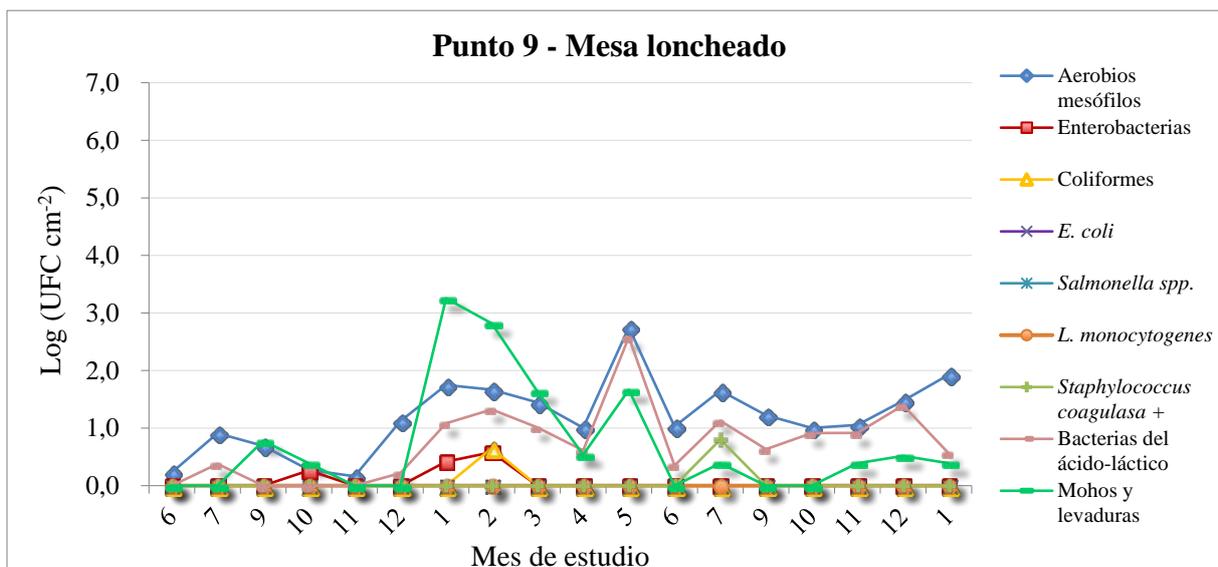
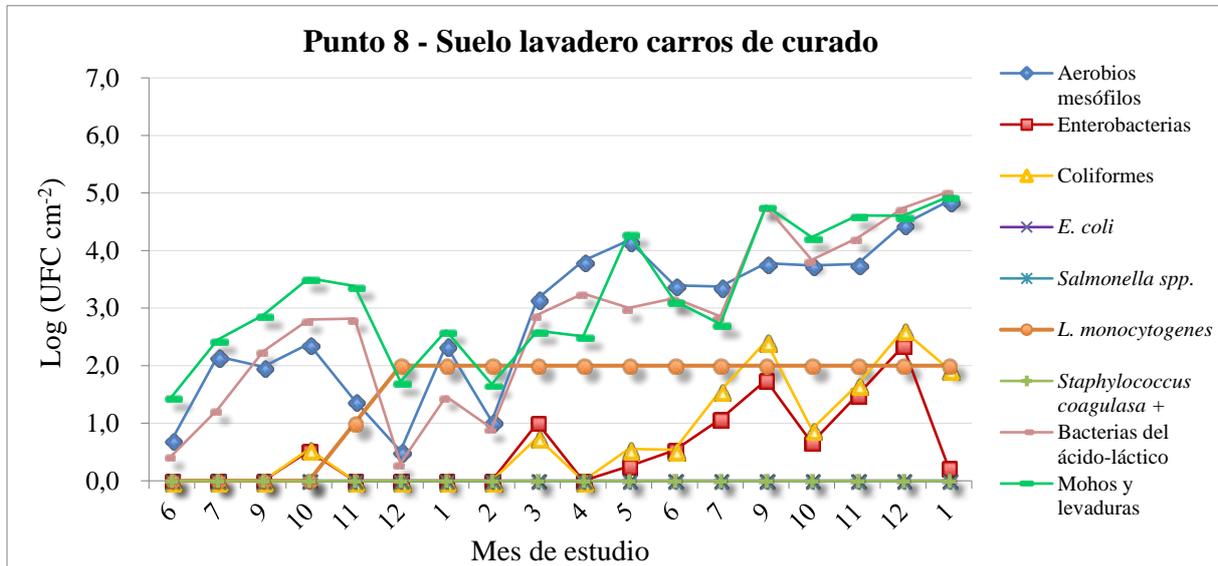
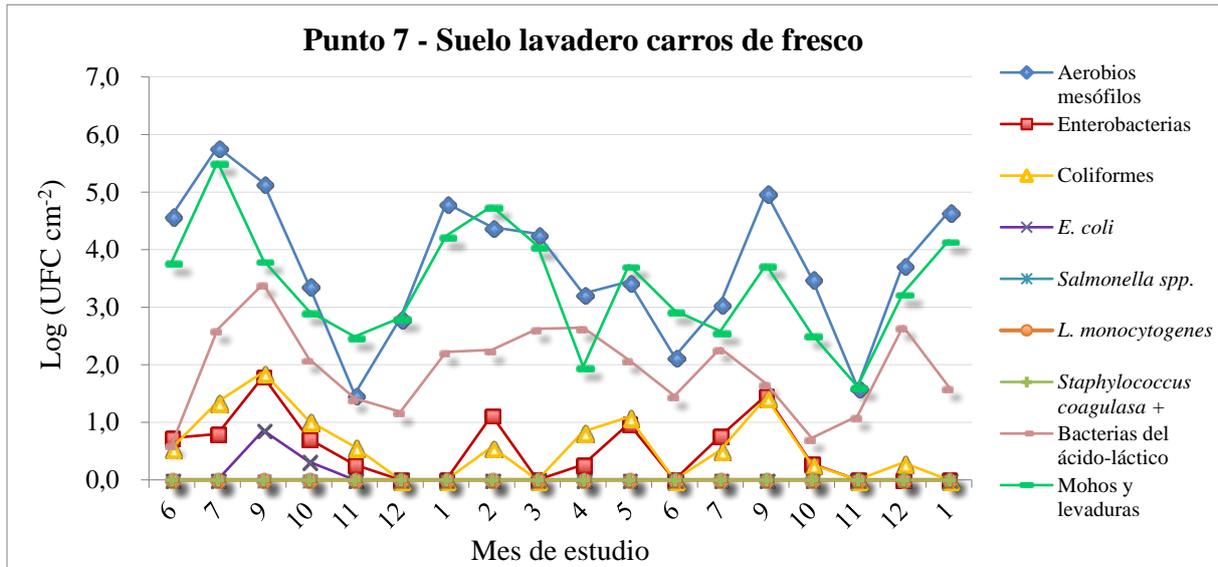
picadoras. En contraste, otros autores han observado que las bacterias residenciales, después de la limpieza y desinfección, son bacterias del ácido láctico, *Staphylococcus* spp. y *Bacillus* spp., aunque como dominante *Yersinia* spp. (Hultman *et al.* 2015). En una comparación realizada a dos industrias cárnicas de diferente escala, Stellato *et al.* (2016) señalaron, que en ambas, se encontraban *Brochothrix* spp., *Psychrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., y *Acinetobacter* spp., pero como dominantes, bacterias del ácido láctico, *Streptococcus* spp. o *Carnobacterium* spp., con la diferencia que, en la industria cárnica de mayor tamaño, entre las bacterias del ácido láctico dominantes también se encontró *Lactococcus* spp.

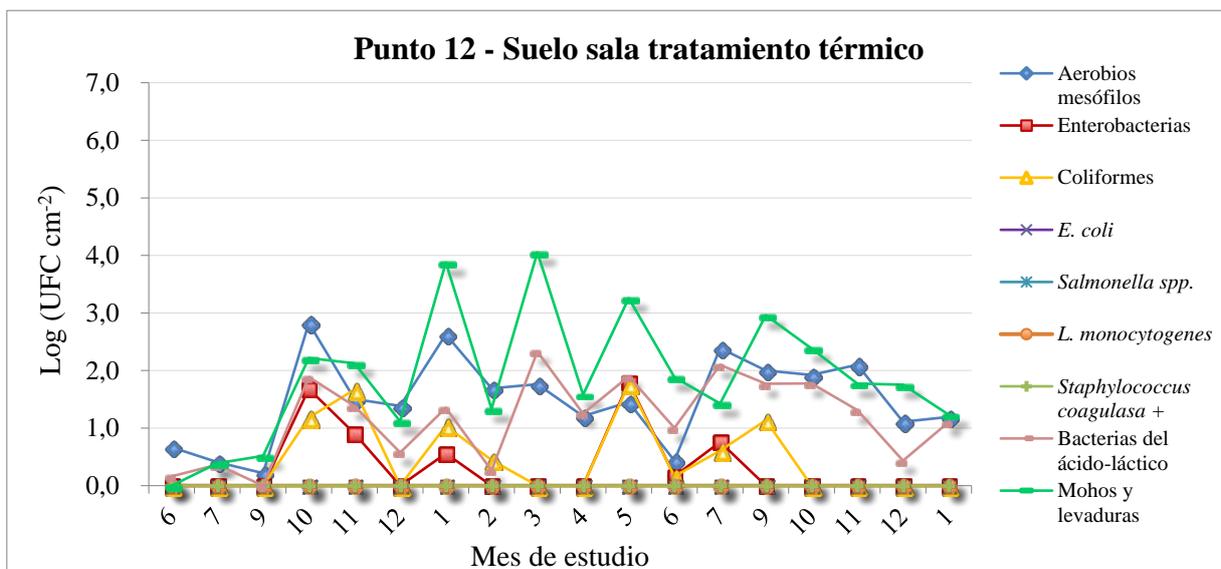
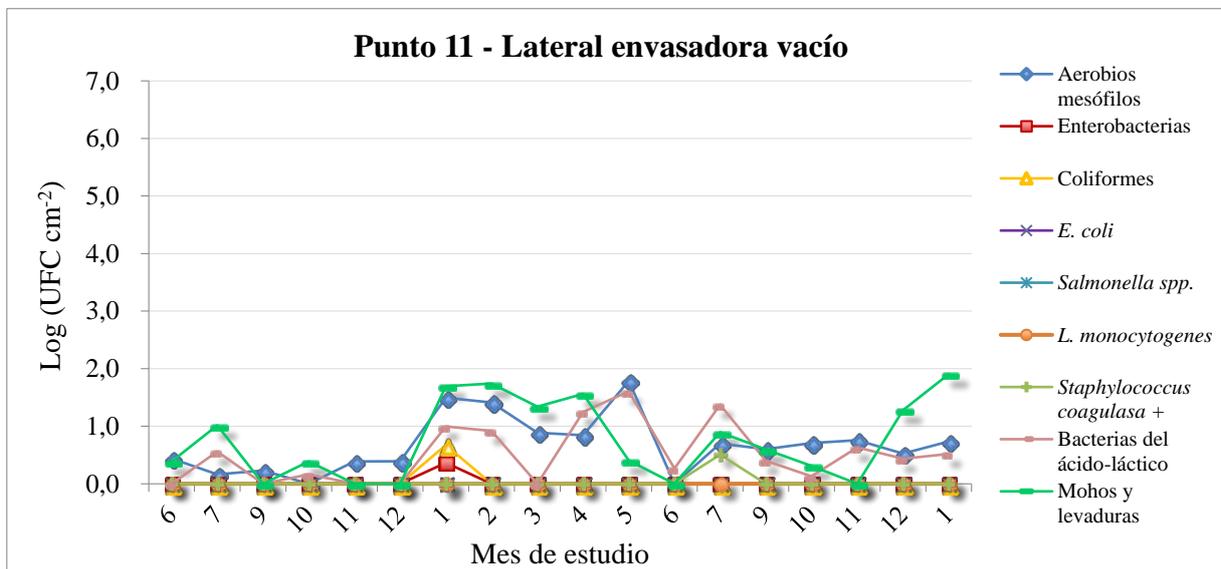
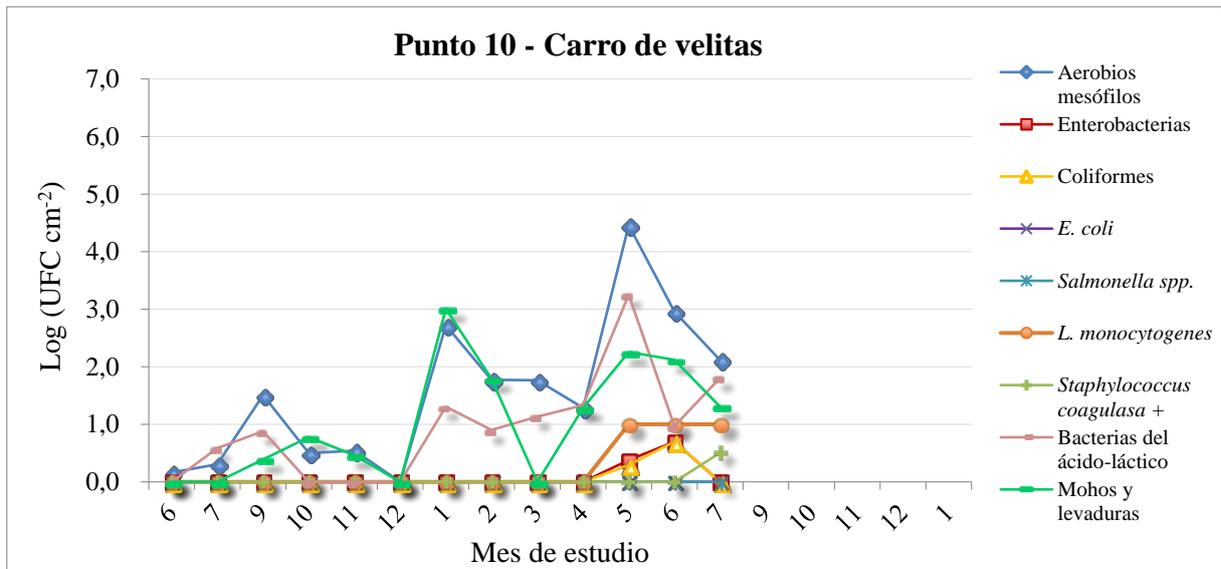
### 2.3. *Evolución mensual de los recuentos microbianos*

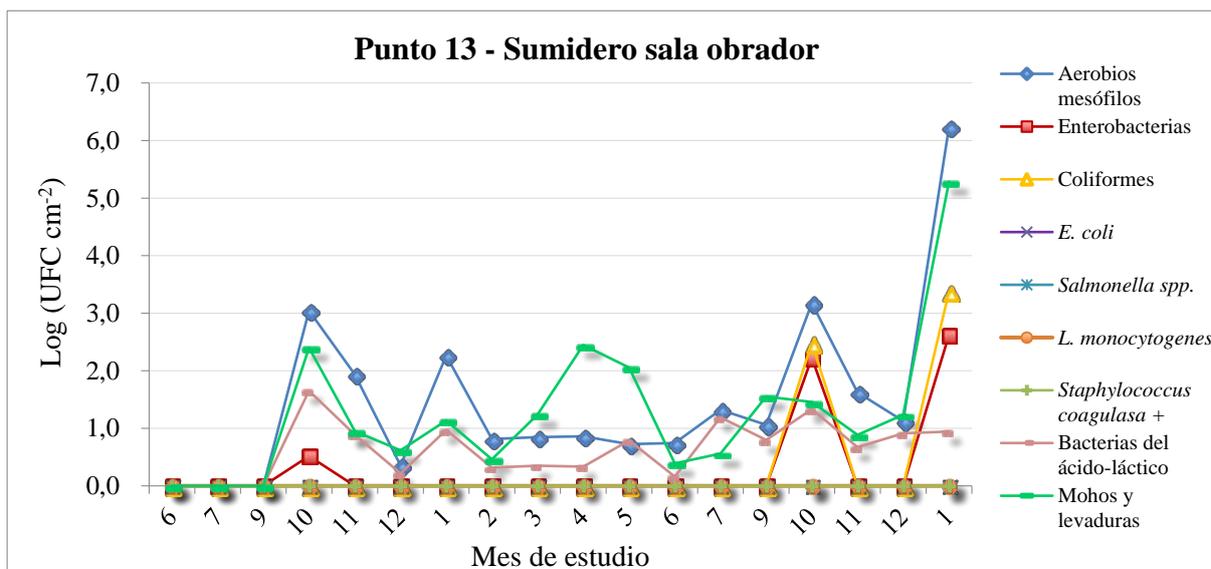
A partir de los recuentos semanales realizados en los puntos de muestreo establecidos, se agruparon los datos a nivel mensual, con el fin de obtener gráficos representativos para así poder observar la evolución de la contaminación de los diferentes grupos microbianos a lo largo del tiempo. A continuación, se presentan los resultados obtenidos (**Figura 17**).











**Figura 17.** Evolución mensual (1 siendo enero a 12 siendo diciembre) de los recuentos microbianos obtenidos en los 13 puntos de muestreo establecidos en la industria cárnica bajo estudio. En el gráfico se observa, por una parte, el recuento en log (UFC cm<sup>-2</sup>) para aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, *E. coli*, *Staphylococcus coagulasa* positivo, bacterias del ácido láctico y, mohos y levaduras, y por la otra parte, detección acumulada de *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes*, asumiendo que cada presencia equivalía a 1.

Los puntos 1, 2 y 3, correspondientes al suelo de la sala de deshuesado, la mesa de loncheado y el sumidero de la sala de loncheado, respectivamente, son los únicos tres puntos que pertenecen a la planta A. Éstos se encuentran en dos zonas adyacentes y, por tanto, muy próximos entre ellos.

Tal y como se puede observar en la **Figura 17**, los tres puntos tienen un perfil de evolución mensual de la contaminación microbiana muy similar, llegando incluso a tener picos máximos parecidos de recuento. Esto ocurrió con los microorganismos aerobios mesófilos en el mes de abril del 2017 o picos máximos de recuentos de bacterias del ácido láctico y mohos y levaduras entre octubre – diciembre de 2016. A lo largo del estudio, en ninguno de estos puntos se encontró presencia ni de *Salmonella spp.* ni *L. monocytogenes*, así como tampoco se obtuvieron recuentos de *E. coli* ni *Staphylococcus coagulasa* positivo. Sin embargo, en abril del 2017, justamente cuando aumentó el pico de contaminación microbiana, se obtuvieron recuentos de enterobacterias y coliformes para los puntos de esta planta industrial, excepto en el punto 1. En los tres puntos, se observa una gran variabilidad a lo largo de los meses en los recuentos obtenidos de aerobios

mesófilos, bacterias del ácido láctico y mohos y levaduras, sugiriendo que hay meses donde se encuentran picos más intensos de contaminación y meses donde la tendencia parece más estable. Los cambios en los niveles de contaminación, en las superficies de la industria alimentaria, pueden ser debidos a variaciones estacionales, condiciones climáticas, fiestas nacionales y periodos vacacionales (Lee *et al.* 2001; Whyte *et al.* 2001). Este hecho puede suponer un riesgo de contaminación, en especial y según estos autores, por unas inadecuadas medidas preventivas relacionadas con fallos en la limpieza y desinfección.

El punto número 4, referente al suelo de la cámara oreo de canales, fue una de las zonas consideradas como mayor contribuyente a la contaminación. En el gráfico presentado en la **Figura 17** se pueden observar unos recuentos elevados, tanto de aerobios mesófilos como de mohos y levaduras, incluso con gran similitud en el patrón mensual de ambos recuentos. Después del matadero, las canales se llevan hasta la cámara de oreo, donde se almacenan hasta llegar a la sala de despiece. La temperatura de esta cámara sufre un descenso, a medida que pasa el tiempo, pero la refrigeración es lenta, pues las canales llegan muy calientes. Por lo general, el perfil de enfriamiento convencional, en las canales de cerdo, suele tener una reducción gradual y sostenida de la temperatura, necesitando un mínimo de 60 minutos para tan solo pasar de 10 °C a 4 °C (Chang *et al.* 2003). Tanto este factor, como el hecho de que haya mucho movimiento en esta zona, podrían ser una razón por la que los recuentos fueron tan elevados.

En la evolución mensual de la contaminación microbiana en el punto 6, referente al suelo de la sala del obrador, se observa una tendencia parecida entre los recuentos obtenidos para aerobios mesófilos y mohos y levaduras. Tal y como se puede apreciar, hay dos picos máximos de estos dos recuentos obtenidos, en ambos años, entre los meses de septiembre y noviembre, encontrándose incluso recuentos de enterobacterias y coliformes. El obrador es la zona donde se elaboran los embutidos y productos adobados, concretamente las velitas de chorizo, salchichón, así como también productos cárnicos, como la morcilla y el chorizo de asar, entre otros. El hecho de encontrarse un aumento de la contaminación de los mismos grupos microbianos, durante dos años consecutivos, podría indicar algún tipo de patrón estacional, en este caso, asociado a la carga de trabajo durante estos meses, donde justamente preparan la campaña de bellota.

En referencia al punto 7, que es el suelo lavadero de los carros de fresco, la contaminación microbiana fue también variable a lo largo de los meses. Es interesante resaltar que parece haber un patrón cíclico en el aumento o disminución de la contaminación microbiana, aunque a distintos niveles de recuento. Al ser una zona dedicada, en especial al lavado de carros, aunque también a todo lo relativo al área de fresco, es considerada como un lugar potencialmente sucio, aunque se encuentre a su vez en contacto con numerosos productos de limpieza. Se usan mangueras para tirar agua a alta presión, que es un método que ha demostrado ser eficaz para retirar la materia orgánica, especialmente cuando los depósitos se encuentran en áreas que son difíciles de alcanzar y penetrar (Marriott *et al.* 2018). No obstante, el volumen de carros y contenedores que se deben limpiar a diario es muy elevado, generando mucho residuo y pudiendo ser este uno de los factores por los cuales hay recuentos elevados en prácticamente todos los grupos microbianos estudiados.

Los puntos 9 y 11, que son la mesa de loncheado y el lateral de la envasadora al vacío respectivamente, fueron puntos con un menor nivel de recuento. El punto 9, se encuentra en la sala de loncheado de la planta B, siendo ésta la sala con más cuidados desde el punto de vista de higiene. Para acceder a ella hay que ponerse una bata desechable y además, desinfectar las suelas del calzado de los trabajadores. El tener un control higiénico mayor podría justificar por qué se encuentra un nivel de contaminación más bajo. En el caso del punto 11, el sensor se instaló en el lateral de la máquina de envasar al vacío, cerca de la bobina de envasado, con la intención de evaluar la carga microbiana a lo largo del tiempo. Como se puede observar en la **Figura 17**, la mayoría de los meses, la carga microbiana es mínima, con un máximo de aerobios mesófilos de 2,0 log (UFC cm<sup>-2</sup>).

La evolución mensual de la contaminación microbiana en el punto 12, referente al suelo de la sala de tratamiento térmico, muestra variabilidad a lo largo del tiempo. En este caso, la tendencia parece indicar que se obtienen mayores recuentos de mohos y levaduras que no de aerobios mesófilos, llegando a recuentos máximos de 4,0 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Además, se obtienen repetidos picos de recuentos de enterobacterias y coliformes. En esta zona los productos envasados se someten a tratamiento térmico, con una finalidad higienizante, sobre todo cuando se van a destinar a EE.UU., Australia o Singapur, que tienen una legislación más restrictiva frente a la presencia de *L. monocytogenes* que en la Unión Europea.

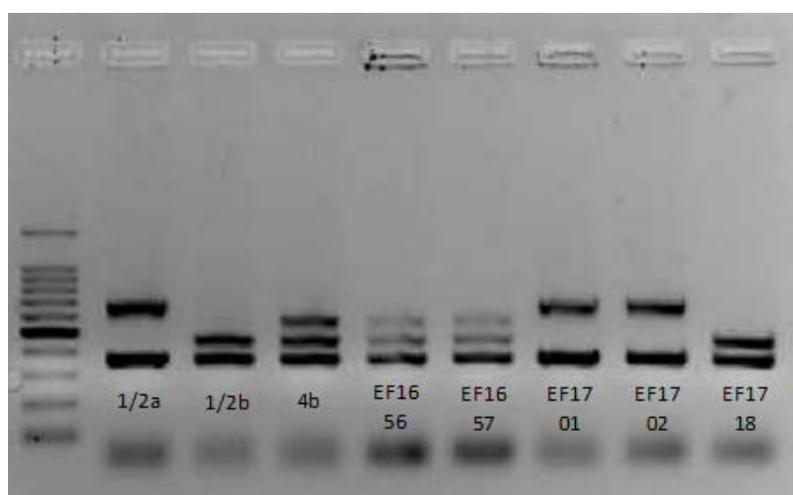
En el punto 13, referente al sumidero de la sala del obrador, se instalaron los sensores 4 meses después de haber empezado el estudio. Tal y como se puede observar en la **Figura 17**, se obtuvo mucha variabilidad en los diferentes recuentos, en especial hacia el final del estudio, donde en el mes de enero de 2018 se llega a niveles de recuento de 6,0 log (UFC cm<sup>-2</sup>), para aerobios mesófilos, y aproximadamente a 3,0 log (UFC cm<sup>-2</sup>) en el caso de enterobacterias y coliformes. Es interesante destacar que la tendencia parece indicar dos picos de contaminación en el mes de octubre en los dos años estudiados.

Finalmente, del total de los puntos, el 5, 8 y 10, referentes al armario de útiles, suelo lavadero de los carros de curado y el carro de velitas, respectivamente, fueron las únicas tres zonas donde se detectó presencia de *L. monocytogenes* (**Figura 17**). Tanto en el punto 5 como en el punto 10, la detección de *L. monocytogenes* se ha visto asociada a recuentos elevados de microorganismos aerobios mesófilos. Este hecho evidencia que puede haber interrelaciones ecológicas entre microorganismos presentes en las superficies, pudiendo, mediante acción sinérgica, estimular la formación de biofilms de este patógeno. Por tanto, esto se debería tener en consideración en la búsqueda de nuevas estrategias para combatir a los biofilms (Røder *et al.* 2015).

La prevalencia de *L. monocytogenes*, en las industrias alimentarias, es más alta cuando hay una mayor producción y no se mantiene controlado el entorno del procesado (Tompkin 2002). En este mismo estudio se expone que, en una industria de pescado ahumado evaluada se detectaron más muestras positivas de *L. monocytogenes* durante los períodos de producción intensiva, correspondientes a los meses de noviembre y diciembre, aspecto que coincide con lo expuesto en el presente estudio. En el punto 8, sin embargo, *L. monocytogenes* se detectó cuando hubo una disminución drástica en los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos, bacterias del ácido láctico y mohos y levaduras. En este caso, su presencia podría deberse a que, al ser una bacteria mal competidora, ésta pudo desarrollarse perfectamente, llegándose a detectar durante dos semanas seguidas. Al mismo tiempo podría indicar que, entre los microorganismos presentes, puede haber inhibidores del crecimiento del patógeno, lo que debe ser estudiado con más profundidad. Estudiar los patrones de crecimiento de este patógeno, junto a otros microorganismos presentes en las superficies de la industria alimentaria, es de gran interés para conocer cómo poder controlarlo. En este sentido, Heir *et al.* (2018) indicaron que, por el momento, hay grandes variaciones en la competitividad de *L.*

*monocytogenes* en condiciones de cultivo multibacteriano y que deberían considerarse, en futuros estudios, este tipo de relaciones para comprender la persistencia del patógeno en las instalaciones de procesamiento de alimentos.

Los cinco aislados de *L. monocytogenes* identificados a lo largo del estudio se analizaron para identificar el serotipo molecular (**Figura 18**). Los serotipos encontrados fueron 1/2a (Lm3 y Lm4, ambos relacionados con el suelo del lavadero del carro de curado), 1/2b (Lm5, relacionado con el carro de velitas) y 4b (Lm1 y Lm2, el primero relacionado con el armario de útiles y el segundo con el suelo del lavadero del carro de curado).



**Figura 18.** Serotipos de *L. monocytogenes* identificados en las superficies industriales, siendo EF1656 el aislado Lm1, EF1657 el aislado Lm2, EF1701 el aislado Lm3, EF1702 el aislado Lm4, y finalmente EF1718 el aislado Lm5.

Uno de los primeros pasos en los estudios epidemiológicos sobre *L. monocytogenes* es la identificación de los serotipos. Como se ha comentado anteriormente, existen por lo menos 13 serotipos distintos, de los cuales 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b, han sido implicados en el 98 % de los casos de listeriosis humana (Kathariou 2002; Chenal-Francisque *et al.* 2011). El estudio de los serotipos con fines epidemiológicos permite una rápida clasificación inicial de los aislados, y tiene una gran importancia por la asociación de determinados serotipos con los brotes de listeriosis (Ortiz *et al.* 2010). Es interesante resaltar que, las cepas de *L. monocytogenes* con serotipo 4b causan la mayoría de brotes

de listeriosis asociados con alimentos y gran parte de los casos esporádicos (López *et al.* 2007), y sin embargo, el serotipo 1/2a es el que se aísla con más frecuencia en muestras de alimentos y ambientales (Ortiz *et al.* 2010).

#### 2.4. Franja de seguridad establecida en base al recuento de aerobios mesófilos

Los resultados obtenidos muestran lo que, hipotéticamente, podría ser una relación entre los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos y la presencia de *L. monocytogenes* en las superficies de la industria alimentaria. Con el objetivo de establecer una franja de seguridad que marque los límites, a partir de los cuales, se puede considerar que la superficie está en situación de riesgo, se ha observado la evolución mensual de los recuentos obtenidos de aerobios mesófilos en los puntos donde se detectó *L. monocytogenes* (**Figura 19**). De acuerdo con estos resultados, cuando el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales está comprendido entre 2 y 4 log (UFC cm<sup>-2</sup>), no se detecta la presencia del patógeno.

Por tanto, se ha observado la existencia de una relación entre el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y la presencia de *L. monocytogenes* en superficies y, esta relación, es variable en función de la misma. Por ello, han surgido tres posibilidades que justifiquen esta situación.

La primera es que haya microorganismos que provoquen una inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*. Cuando su recuento aumenta, el patógeno no puede crecer, puesto que debería existir una incompatibilidad en el crecimiento mixto. Sin embargo, cuando el recuento baja, el patógeno puede multiplicarse. Por otra parte, si los inhibidores no están presentes o no pueden competir con otros microorganismos, *L. monocytogenes* crecería en un entorno ecológico diferente. A ésta se la podría denominar **teoría de la inhibición competitiva** del crecimiento con el patógeno.

La segunda es que existan microorganismos facilitadores del crecimiento del patógeno. En este caso, al aumentar el recuento de aerobios totales, se detectaría el patógeno. Si estos se inhiben, *Listeria* tendría más problemas para crecer con otras bacterias, por lo

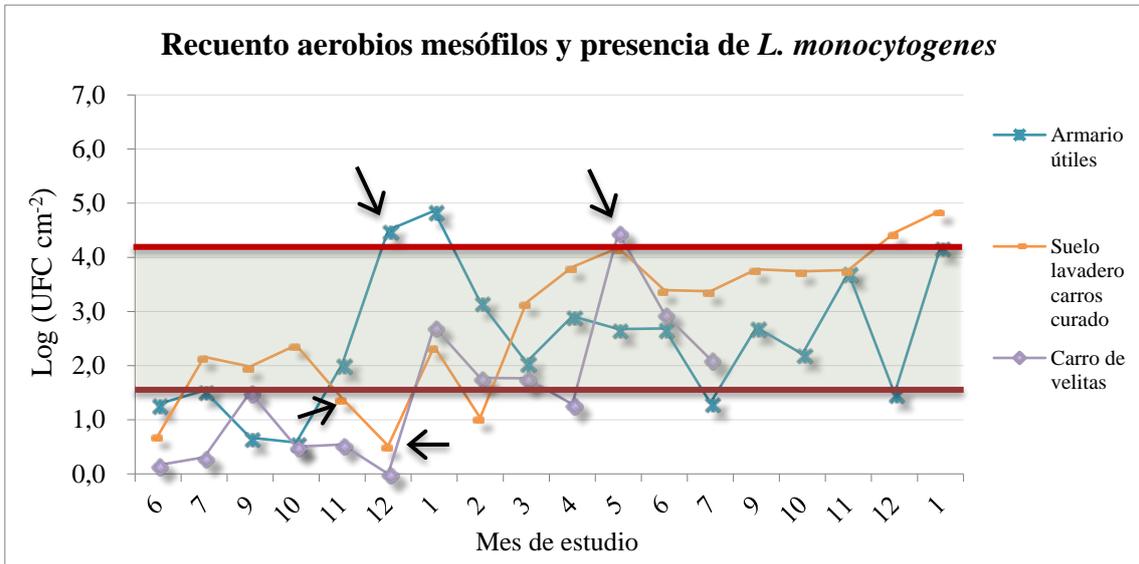
que se observaría una detección positiva al reducir el recuento de totales. Ésta se podría denominar como **teoría de la estimulación competitiva**.

La tercera y última implicaría que se puedan dar las dos posibilidades comentadas anteriormente. Así, cuando se produce una competencia positiva, el patógeno podría multiplicarse y ser detectado en superficies. Por el contrario, si se produce una competencia negativa, sólo se detectaría el patógeno cuando la carga de los microorganismos aerobios totales se ve controlada. Ésta podría denominarse **teoría de la competencia variable**.

Dependiendo de qué teoría sea cierta, las consecuencias respecto a la higienización de superficies podrían suponer la estimulación del crecimiento de *L. monocytogenes*, con el consiguiente riesgo para los consumidores. En el caso de que fuera cierta la teoría de la inhibición competitiva, una higienización muy eficiente, con reducción importante de la carga de totales, aseguraría la presencia del patógeno.

Según los resultados obtenidos, se observan dos situaciones diferentes. La primera, asociada al armario de útiles y al carro de velitas, ésta es debida a la detección del patógeno cuando los recuentos de aerobios mesófilos superan 4 log (UFC cm<sup>-2</sup>). La segunda, asociada al suelo del lavadero de los carros de curado, es debida a la detección de *L. monocytogenes* cuando el recuento está por debajo de 1,5 log (UFC cm<sup>-2</sup>). En base a los resultados obtenidos, se podrían establecer los valores límite de recuento de aerobios totales, por una parte 4 log (UFC cm<sup>-2</sup>), y por la otra parte 1,5 log (UFC cm<sup>-2</sup>), como límites de control interno en estas superficies. No obstante, los recuentos máximos de aerobios mesófilos, tanto en el armario de útiles como en el carro de velitas, no se volvieron a repetir, por lo que no se pudo observar, si un nuevo aumento en los recuentos de este grupo microbiano, se relacionaban con la detección de *L. monocytogenes*. Sí que es cierto que, en la detección de *L. monocytogenes* del armario de útiles, al siguiente mes hay un aumento de la carga microbiana y no se obtiene presencia del patógeno. Pero, al haber comunicado a la empresa la detección de *L. monocytogenes*, se tomaron medidas asociadas de limpieza y desinfección, pudiendo ser éste un motivo a la no detección del patógeno. Respecto al suelo del lavadero de carros de curado, no se vuelve a obtener una carga baja hasta el mes de febrero de 2017 y, a continuación, un aumento progresivo de los recuentos obtenidos de aerobios mesófilos hasta el final del estudio. Ésto implica que

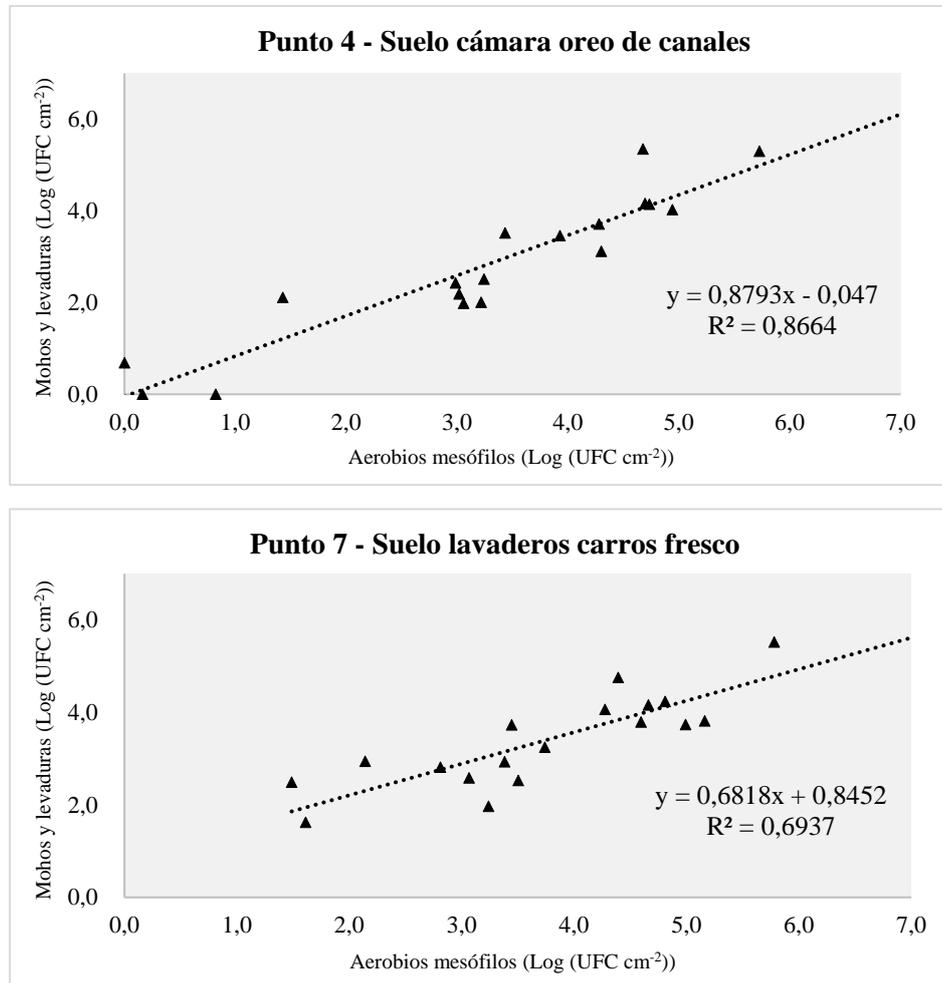
será necesario diseñar otro estudio, para poder verificar y corroborar qué situación se está produciendo.



**Figura 19.** Establecimiento de una franja de seguridad en base al recuento de microorganismos aerobios como posible marcador a la presencia de *L. monocytogenes* en superficies industriales. Los resultados se expresan en log (UFC cm<sup>-2</sup>) a lo largo de los meses de estudio (1 siendo enero a 12 siendo diciembre). Las flechas indican las detecciones obtenidas de *L. monocytogenes*.

Se ha podido observar también una relación entre el recuento de mohos y levaduras y el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en diferentes puntos de muestreo (**Figura 20**). Esto sugiere una posible interacción simbiótica entre ambos grupos microbianos, quizás mediante la producción de cofactores de crecimiento por parte de las levaduras. Sieuwerts *et al.* (2018) demostraron que, durante la fermentación de la masa para panificación, el crecimiento de *Lactobacillus sanfranciscensis* estaba estimulado por un cofactor secretado por *Saccharomyces cerevisiae*, sugiriendo que las levaduras son capaces de producir cofactores de crecimiento que estimulan determinados grupos microbianos. La naturaleza y la eficacia de estos factores de crecimiento dependen de la especie objetivo y de la fuente de carbono suministrada. Por esta razón es necesaria una investigación futura en este sentido, así como también la búsqueda de microorganismos potenciadores o inhibidores del crecimiento de *L. monocytogenes* con el objetivo de

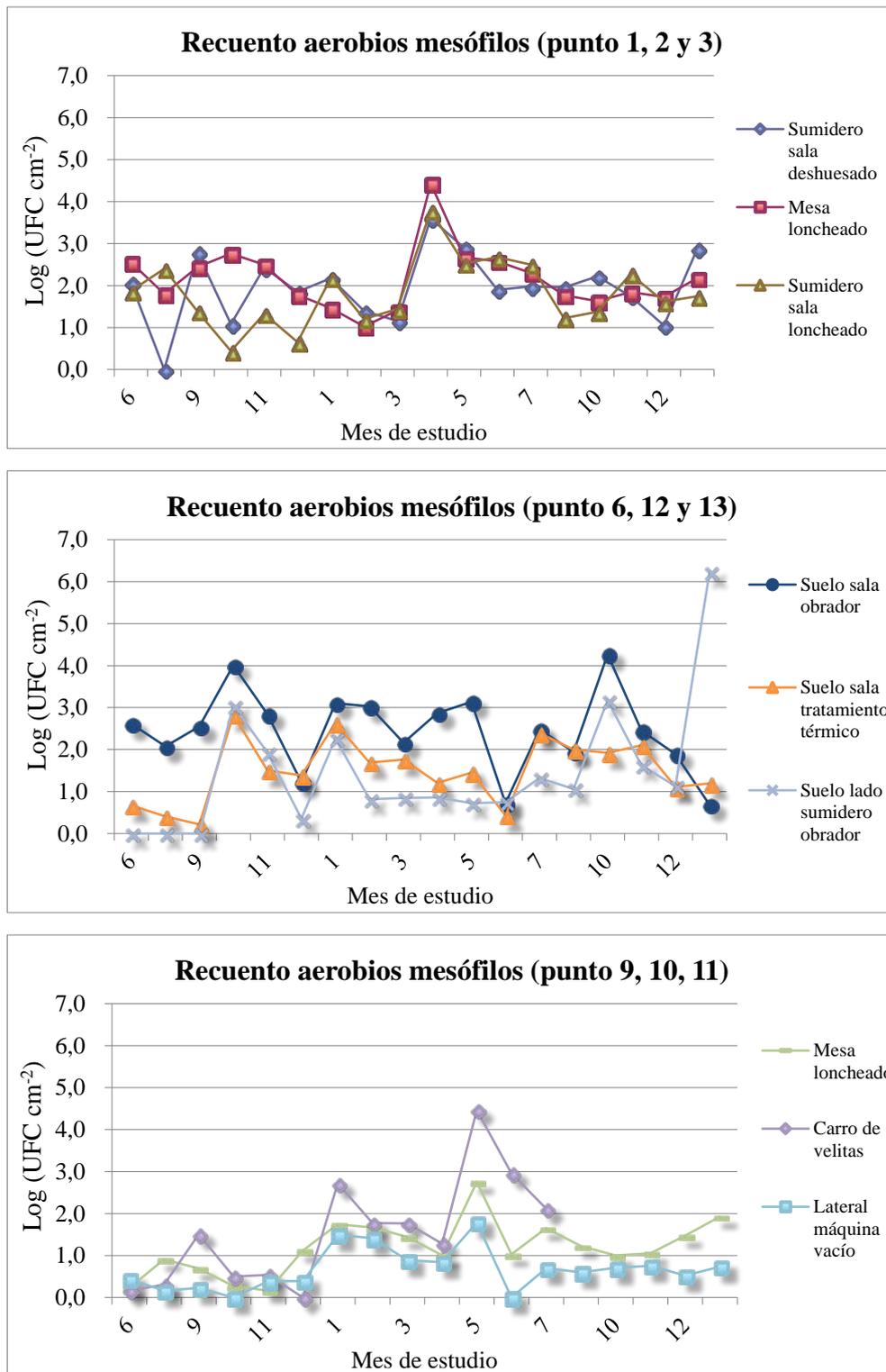
encontrar una microbiota no patogénica y además no alterante para el producto que sea constante en el tiempo.



**Figura 20.** Correlación entre el recuento obtenido de aerobios totales y, mohos y levaduras, en dos de los puntos donde el perfil de crecimiento entre los dos grupos microbianos es similar.

### 2.5. Elección de los puntos de muestreo representativos dentro de los clústeres

Teniendo en consideración la posible relación entre los recuentos de aerobios mesófilos y la presencia de *L. monocytogenes*, así como con el objetivo de seleccionar los puntos más representativos, a seguir controlando, dentro de esta empresa en un futuro, se compararon los recuentos de aerobios mesófilos obtenidos, entre los diferentes puntos, dentro de la agrupación de las zonas con menor grado de contaminación (**Figura 21**).



**Figura 21.** Evolución mensual (1 siendo enero a 12 siendo diciembre) de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos en log (UFC cm<sup>-2</sup>) agrupados por subgrupos dentro del clúster de superficies con menor grado de contaminación.

En los primeros tres puntos, que corresponden a la planta A de estudio, una vez agrupados, se puede observar como el punto 2, que corresponde a la mesa de loncheado, se mantienen los recuentos de aerobios totales en la zona intermedia, respecto a los otros dos puntos, incluso encontrándose en el pico máximo de contaminación. Por esta razón, sería conveniente la selección de la mesa de loncheado como punto representativo a tener en consideración para seguir controlándolo a nivel interno.

En referencia a los puntos 6, 12 y 13, se podrían considerar que tienen un perfil de recuento de aerobios mesófilos parecido, variable en función del mes de estudio, indicando la posible estacionalidad. No obstante, en el punto 6 es donde se obtienen valores máximos de recuento, en comparación con los puntos 12 y 13 a lo largo de los meses de estudio. Por esta razón, el punto a considerar como posible control interno en el screening de puntos sería el 6, correspondiente al suelo de la sala del obrador. Con el análisis de éste, se podría intuir el estado higiénico del resto. Hay que destacar que, el punto 13, justo en el último mes de estudio, aumenta considerablemente el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, pasando de obtener recuentos alrededor de 1-3 log (UFC cm<sup>-2</sup>), a lo largo de los meses, a obtener 6 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Este hecho se debería evaluar, no sólo para ver qué ha ocurrido, sino para observar también si los recuentos se mantienen tan elevados a partir de este momento.

Los tres últimos puntos, referentes al 9, 10 y 11, y englobados en el clúster que representaba menos contaminación, la superficie con mayor grado de interés, como control interno, es el carro de velitas. El sensor de este punto se dejó de enviar a finales de julio de 2017, porque la empresa tiene un gran volumen de carros y no se localizó en todo este tiempo. Esto indica que deberían tener un control más intenso de los carros que tienen en uso, ya que además éstos llevan consigo producto a madurar. Este punto podría dar también una idea de la contaminación del producto acabado y la posible interacción de la contaminación cruzada entre el producto y las superficies. Sería ideal que el punto seleccionado, para el control interno, fuera por tanto el carro de velitas, ya que además se ha obtenido presencia de *L. monocytogenes* en una ocasión. Además los carros, al ser desplazados por muchas zonas diferentes, llevar producto y estar en contacto directo con el mismo, podrían ser un reservorio potencial del patógeno.



**V. Desarrollo de un modelo *in vitro* para la formación de biofilms maduros por *Listeria monocytogenes* en superficies de contacto con alimentos**



## 1. Materiales y métodos

### 1.1. Superficies de estudio

En este estudio se emplearon dos materiales distintos, por una parte, discos de acero inoxidable AISI 316 con grado 2B de 2 cm de diámetro y 1 mm de grosor y, por la otra, superficies de poliestireno (microplacas de 96 pocillos Microtiter). Antes de ser empleados, ambos materiales fueron sometidos a procedimientos de limpieza y desinfección. Los discos de acero inoxidable se limpiaron con un detergente no bactericida (ADIS Higiene, Madrid, España), seguidamente se desinfectaron con isopropanol al 70 % (Panreac Química, Castellar del Vallès, España) y se dejaron secar en una cabina de flujo laminar (PV-30/70, Telstar, Terrasa, España), de acuerdo con la norma europea UNE-EN 13697:2015 respecto a materiales no porosos (AENOR 2015). Con el objetivo de garantizar que los discos de acero inoxidable estuvieran completamente estériles, se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C, antes de la inoculación bacteriana. Las microplacas, por el contrario, sólo se desinfectaron con etanol al 70 % y se secaron en campana de flujo laminar vertical.

### 1.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron un total de seis cepas del género *Listeria*, obtenidas como cultivos liofilizados y procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, Valencia, España). Éstas fueron: *Listeria innocua* CECT 910, *L. monocytogenes* CECT 935, *L. monocytogenes* CECT 5366, *L. monocytogenes* CECT 5672, *L. monocytogenes* CECT 5873 y *L. monocytogenes* CECT 911.

Las cepas liofilizadas fueron rehidratadas en 9,0 ml de caldo Triptona de Soja (TSB; Oxoid, Madrid, España) e incubadas a 30 °C durante 40-48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron por el método de estría en superficie en TSA (Oxoid, Madrid, España) y se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. A partir del cultivo, se resembraron colonias aisladas en tubos inclinados de TSA, con el fin de obtener cultivos stock. Éstos se incubaron a 37 °C durante 24 horas y, posteriormente se almacenaron a una temperatura de 4 °C durante un periodo máximo de un mes.

### 1.3. Preparación del inóculo

A partir del cultivo stock en tubo inclinado, se realizó un subcultivo mediante siembra por agotamiento en placas de TSA, que se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas, obteniendo de esta manera cultivos en la fase estacionaria. De dichos cultivos, se prepararon los inóculos bacterianos para la posterior formación de biofilms. Para la medida de la concentración microbiana se empleó un densitómetro (DENSIMAT, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) que se utiliza para medir la turbidez de un inóculo bacteriano. Mediante este equipo se obtuvieron lecturas en unidades McFarland, con las que se pudo estimar la concentración del mismo, con una curva patrón previa. El inóculo se preparó transfiriendo varias colonias aisladas en TSB, en el caso de *L. innocua*, y en TSYEB<sub>gluc1%+NaCl2%</sub> [TSB suplementado con 0,3 % p/v de extracto de levadura (BD, Madrid, España), 1 % p/v de glucosa (BioLife, Barcelona, España) y cloruro de sodio al 2 % p/v (NaCl, Panreac, Castellar del Vallès, España)] en el caso de *L. monocytogenes* CECT 935, hasta que se alcanzó una turbidez de 0,1 unidades McFarland, equivalente aproximadamente a 10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup>.

La suspensión bacteriana se diluyó decimalmente en Solución Salina Triptona [TSS; 1 g de triptona (BD, Madrid, España) y 8,5 g de NaCl por cada litro, ajustando el pH a 7,0 ± 0,2]. La concentración inicial de inóculo se determinó utilizando el sistema TEMPO.

### 1.4. Desarrollo del modelo de formación de biofilms *in vitro*

El desarrollo del modelo de formación de biofilms *in vitro* se realizó con *L. innocua* CECT 910 y *L. monocytogenes* CECT 935, esta última por ser considerada de referencia entre las cepas de este patógeno (ISO 11290-2, AENOR 1998). Para la formación de los biofilms, se inocularon 30 µl de la suspensión bacteriana preparada en el centro de cada disco, dando como resultado una concentración aproximada en la superficie de 5,5 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Los discos se colocaron en placas de Petri estériles y posteriormente se introdujeron en una cámara húmeda, para ser incubados a 30 °C, con el objetivo de promover el crecimiento bacteriano y la consecuente formación de biofilms, bajo condiciones húmedas (Fuster-Valls *et al.* 2008).

Se ensayaron diversos períodos de incubación en condiciones estáticas y diferentes renovaciones del medio de cultivo, sobre los discos inoculados, para determinar bajo qué condiciones se obtenía una mayor formación de biofilms (**Tabla 7**). La renovación del medio de cultivo se llevó a cabo lavando los discos inoculados, con 3 ml de agua destilada estéril, por duplicado, y añadiendo 30 µl del medio de cultivo TSB o TSYEB<sub>gluc1%+NaCl2%</sub> en los discos, con el objetivo de promover el desarrollo de las células adheridas y consecuentemente, la formación de biofilms. Finalmente, los discos de acero inoxidable se incubaron, una vez más, en las condiciones experimentales establecidas.

**Tabla 7.** Períodos de incubación empleados para la formación de biofilms de *L. innocua* CECT 910 y *L. monocytogenes* CECT 935 en superficies de acero inoxidable.

Periodo inicial de incubación	Periodo de incubación post lavado
24 h	+ 0 h
	+ 24 h
	+ 48 h
	+ 72 h
48 h	+ 0 h
	+ 24 h
	+ 48 h
	+ 24 h + 24 h
	+ 24 h + 24 h + 72 h
72 h	+ 24 h + 24 h + 72 h + 24 h
	+ 0 h
	+ 24 h

### 1.5. Evaluación de la formación de biofilms mediante DEM

Después del período de incubación, los discos de acero inoxidable se lavaron dos veces con 3 ml de agua destilada estéril, para retirar todas aquellas células no adheridas y a continuación, se tiñeron con 5 µl de la tinción vital Live/Dead BacLight (Molecular Probes, Oregon, EE. UU.) y se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Este kit emplea dos fluorocromos de ácidos nucleicos: SYTO 9 y yoduro de propidio. El primero penetra en las células, tanto con membranas lesionadas, como aquellas con la membrana intacta. Sin embargo, el segundo fluorocromo, sólo penetra en las células con la membrana lesionada, produciendo una reducción del colorante SYTO

9. De esta manera, con la aplicación simultánea de ambos colorantes, en la proporción adecuada, las células viables, con membrana intacta, fluorescen en verde y las células muertas o lesionadas, en rojo.

Después de la incubación, las superficies teñidas se evaluaron por DEM, utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51/BX52 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con una lámpara de mercurio de 100 W (USH-103OL, Olympus), un filtro de doble paso (U-M51004 F/R – V2, Olympus) y acoplado a una cámara digital (DP73, Olympus). Los discos se observaron con un objetivo de 20X, no sólo para examinar la estructura del biofilm formado, sino para determinar también la viabilidad de sus células y enumerar las bacterias totales que lo forman. Para la cuantificación de las células viables y no viables se tomaron 10 fotografías al azar, de 10 campos distintos por cada muestra, correspondientes a 0,16 mm<sup>2</sup>, con lo que se obtuvo una estimación del número de células por centímetro cuadrado. Esto se realizó analizando las imágenes, mediante el software Auto 3.2 (Soft Imaging System GMBH, Münster, Alemania). De esta manera, se obtuvo el área media de las células y la superficie ocupada por el biofilm en cada imagen. El número total de células se obtuvo, dividiendo la superficie media ocupada por el biofilm, entre el área de las células. Los resultados se expresaron como el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado.

#### ***1.6. Evaluación de la matriz del biofilm producida, durante los diferentes periodos de incubación***

Para determinar la producción de la matriz de los biofilms, los discos de acero inoxidable inoculados con *L. monocytogenes* e incubados en diferentes periodos, se lavaron con 3 ml de agua destilada estéril por duplicado y, a continuación, fueron teñidos con 200 µl de una tinción específica de matriz, FilmTracer Sypro Ruby Biofilm Matrix Stain (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España). Se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La tinción marca la mayor parte de proteínas, incluidas glicoproteínas, fosfoproteínas, lipoproteínas, proteínas de unión a calcio o proteínas fibrilares, las cuales han demostrado ser componentes estructurales importantes en biofilms de *L. monocytogenes* (Colagiorgi *et al.* 2016). Después de la incubación, las superficies teñidas se evaluaron por DEM.

Con el objetivo de observar los diferentes componentes, que forman la matriz de los biofilms de *L. monocytogenes*, las muestras también se tiñeron con distintos *pools* de colorantes diferenciales fluorescentes, que se unen de forma selectiva a determinados sustratos. Los colorantes empleados fueron concanavalina A-Alexa Fluor 594 (ConA 594; ThermoFisher Scientific, Barcelona, España) que se une selectivamente a residuos de  $\alpha$ -manopiranosil y  $\alpha$ -glucopiranosil, como la amilopectina o el dextrano (Strathmann *et al.* 2002; Stiefel *et al.* 2016a), observándose mediante fluorescencia en rojo; fluoresceína-5-isotiocianato (FITC, Sigma-Aldrich, Madrid, España), que tiene afinidad por las proteínas, a través de los grupos amino, concretamente el grupo isotiocianato reacciona con los grupos aminos terminales y aminas primarias (M.Y. Chen *et al.* 2007), produciendo fluorescencia verde; azul Nilo (AN, Sigma-Aldrich, Madrid, España), que tiene afinidad por los lípidos neutros (Sindhu *et al.* 2011) y fluoresce en azul; y, finalmente, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, ThermoFisher Scientific, Barcelona, España) que tiene afinidad por el ADN, resultando en una fluorescencia azul.

Se prepararon soluciones madre de estos colorantes fluorescentes a una concentración de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  en 0,1 M de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ , Panreac, Castellar del Vallès, España) para evitar la dimerización del colorante ConA 594, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estas soluciones madre se almacenaron a temperatura de refrigeración como stock. Antes de su uso, las soluciones de ConA 594 y FITC se diluyeron con 0.1 M de  $\text{NaHCO}_3$ , debido a su alta intensidad (Guerrero-Navarro 2017). Una vez teñidas, las superficies se incubaron en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente, para asegurar, por una parte, la penetración completa de los colorantes en toda la estructura y, por otra, la fotoactivación de los colorantes. Posteriormente, las superficies se evaluaron mediante DEM.

### **1.7. Estudio de la morfología y topografía de biofilms**

Con el objetivo de estudiar la rugosidad y las distintas capas de los biofilms, las muestras se analizaron por microscopía confocal láser de barrido (CLSM), mediante un microscopio Spectral Multiphoton Leica TCS SP5 (Leica Microsistemas, Barcelona, España). Esta tecnología permite buscar la composición de las capas internas de las muestras, mediante un software especializado IMARIS 7.1 (Bitplane, Zúrich, Suiza),

recreando la composición tridimensional (3D) y juntando grupos de microfotografías en un solo modelo 3D. Las muestras se analizaron utilizando un objetivo 40-60X, capturando información de cada microfotografía por triplicado, una toma por cada canal, analizado según la emisión de cada colorante (617 nm para ConA 594; 518 nm para FITC, 596 nm para AN, y finalmente 461 nm para DAPI).

Para la observación de la topografía de los biofilms producidos por *L. monocytogenes*, en superficies de acero inoxidable, se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) EVO MA 10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las muestras fueron procesadas por el Servei de Microscòpia (UAB, Bellaterra, España), donde se les aplicó un secado del punto crítico, donde el agua de la muestra se sustituye por alcohol o acetona y éstos, a su vez, por CO<sub>2</sub> líquido y se metalizaron para la posterior observación mediante SEM. Las superficies, una vez procesadas, fueron introducidas en una columna de vacío y se procedió a la observación de las muestras. La imagen se creó mediante el disparo de un haz de electrones, que fueron reflejados por la muestra, y posteriormente detectados, para convertir la señal recibida en píxeles de una imagen digitalizada.

### ***1.8. Efecto de un recubrimiento proteico en superficies sobre la formación de biofilms de L. monocytogenes***

Se preparó una solución proteica que contenía 5 % de leche desnatada, 0,5 % de Tween 80 (Scharlab, Barcelona, Spain) y una pastilla de tampón fosfato salino (PBS; Sigma-Aldrich, Madrid, España) por cada 200 ml de agua. La solución se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y posteriormente, se añadieron 200 µl de la solución proteica a discos de acero inoxidable, repartiéndolos por la superficie, y en las microplacas de 96 pocillos. El conjunto se incubó en una estufa a 37 °C durante dos horas, con el objetivo de promover la adherencia de proteínas a la superficie. A continuación, se retiró el exceso de solución, aplicando 3 ml de agua destilada estéril sobre el disco. En el caso de las microplacas, retirando la solución proteica y, a continuación, enjuagando con 200 µl de agua destilada estéril.

Los discos y las microplacas se almacenaron en refrigeración durante toda la noche, para ser inoculados al día siguiente. Se realizó una comparación de la adhesión de *L.*

*monocytogenes* al material, para ver la influencia que tenía el recubrimiento proteico como posible residuo en la industria alimentaria, en la formación de biofilms de *L. monocytogenes*.

Los ensayos de producción de biofilms se llevaron a cabo preparando un inóculo con las diferentes cepas de *L. monocytogenes* en TSYEB<sub>gluc1%+NaCl2%</sub>, tal y como han sido descritos en la sección 1.3. A partir de esta suspensión, se inocularon 30 µl en los discos de acero inoxidable y 100 µl en las placas microtiter. Las superficies inoculadas se incubaron a 30 °C, en condiciones estáticas, durante una semana, con renovación del medio de cultivo a las 48 horas + 24 horas + 24 horas + 72 horas. El efecto del recubrimiento proteico en la formación de biofilms, sobre superficies de acero inoxidable, se evaluó mediante DEM, siguiendo la metodología descrita en la sección 1.5. Sin embargo, las superficies de poliestireno se evaluaron mediante el ensayo de cristal violeta que se basa en la medición de la biomasa adherida (Djordjevic *et al.* 2002; Pan *et al.* 2010). Tras su incubación, las microplacas se lavaron dos veces con agua destilada estéril (100 µl/pocillo), con el objetivo de descartar las células no adheridas, y se dejaron secar en campana de flujo laminar vertical durante 45 minutos. La tinción de las células adheridas se realizó con una solución acuosa de cristal violeta (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 0,8 % (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron los pocillos con 100 µl de agua destilada estéril, para retirar el exceso de colorante. En este punto, el conjunto de células adheridas a la superficie eran visibles como anillos violeta, formados en la base del pozo. Para proceder con el análisis cuantitativo de las mismas, el cristal violeta se solubilizó, añadiendo 150 µl de etanol al 95 %, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución del cristal violeta fue medida en un espectrofotómetro para microplacas (340 ATTC, SLT Labinstruments, Viena, Austria) a una densidad óptica de 595 (OD<sub>595</sub>). Además, se realizó una curva patrón, para correlacionar el nivel de colorante con el número de bacterias teñidas en los pocillos (ver Capítulo VI sección 1.7). Los resultados se expresaron en log (CFU cm<sup>-2</sup>) y no en valores de OD<sub>595</sub>.

### **1.9. Análisis estadístico**

Los recuentos bacterianos obtenidos se sometieron a una transformación logarítmica decimal, con el objetivo de reducir la variabilidad habitual de los análisis microbiológicos. Para verificar las condiciones previas a la realización de un análisis de variancia, se realizó una comprobación de la normalidad en las poblaciones estudiadas, mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y se realizó una prueba de Levene, para comprobar si había igualdad entre varianzas. Una vez cumplidas las condiciones de la prueba, los resultados fueron evaluados por análisis de variancia (ANOVA), con un contraste *a posteriori* mediante la prueba de Tukey.

Para todo ello, se utilizó el paquete de software estadístico R v3.4.3. Una  $P < 0,05$  se estableció como nivel de significación. Las diferencias globales se examinaron después de un análisis de los conjuntos de datos individuales.

## 2. Resultados y discusión

### 2.1. Elección de $TSYEB_{gluc1\%+NaCl2\%}$ como medio de cultivo para la formación de biofilms de *L. monocytogenes*

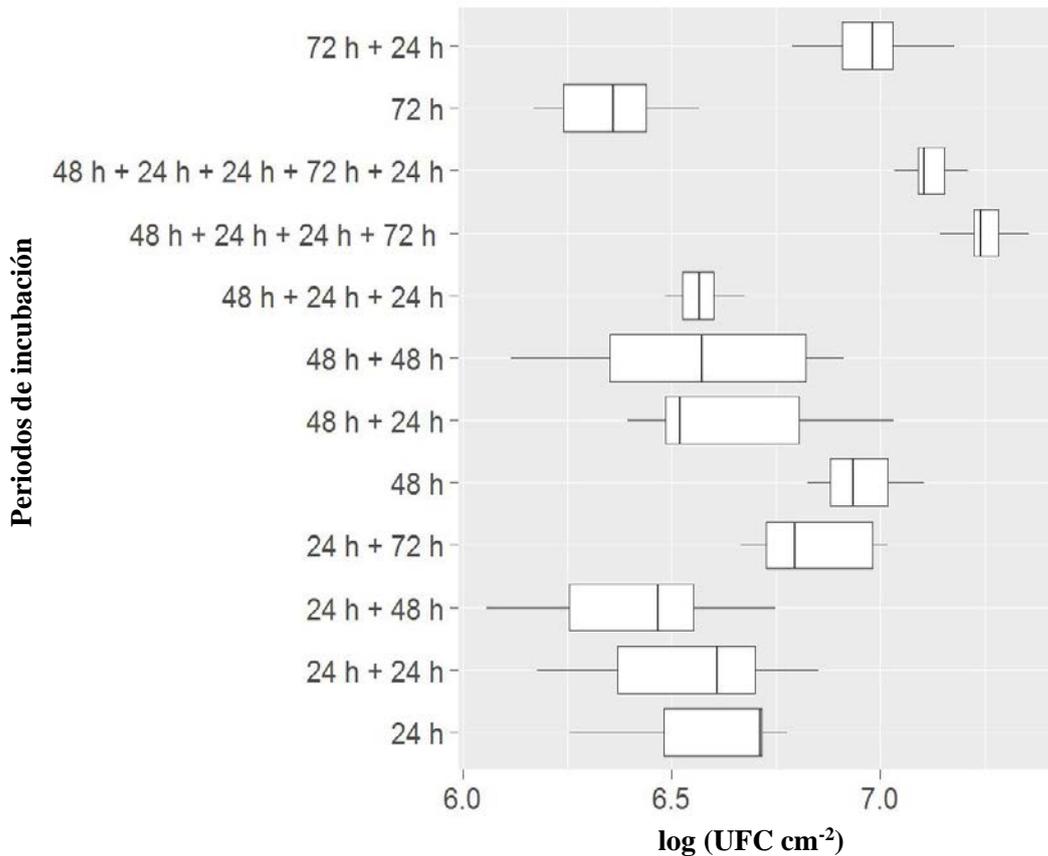
*L. monocytogenes* es un organismo ubicuo, que puede crecer en una gran variedad de ambientes, utilizando diferentes fuentes de nutrientes (Rocourt *et al.* 2003). Estudios previos han demostrado que, los medios de cultivo utilizados, afectan directamente al crecimiento y posterior formación de biofilms de *L. monocytogenes* (Poulsen 1999). De acuerdo con este hecho, Pan *et al.* (2010) demostraron que, determinadas concentraciones de cloruro sódico y glucosa, juegan un papel crucial en la formación de biofilms de este patógeno. En su estudio, se comparó el medio TSYEB con  $TSYEB_{gluc1\%+NaCl2\%}$  como medios de crecimiento, concluyendo que la mayor parte de las cepas de *L. monocytogenes*, empleadas en el estudio, exhibieron una mejor formación de biofilms a 30 °C cuando se añadieron concentraciones del 2 % de cloruro sódico y 1 % de glucosa. Por esta razón, se eligió  $TSYEB_{gluc1\% NaCl2\%}$  como medio de cultivo a emplear en el estudio.

### 2.2. Formación de biofilms de *L. monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable

El objetivo principal de este estudio fue la evaluación del tiempo requerido para la formación de biofilms maduros de *L. monocytogenes*. Con la metodología empleada para la formación de biofilms, se seleccionaban las células adheridas a la superficie de acero inoxidable y, a su vez, se descartaban aquellas que no mostraban dicha capacidad mediante los lavados realizados.

La influencia de los periodos de incubación, tanto inicial como post lavado, sobre la formación de biofilms de este patógeno, se investigó mediante DEM. Se calcularon sus respectivos recuentos microbianos expresándolos en log (UFC cm<sup>-2</sup>) (**Figura 22**). Los períodos iniciales de incubación establecidos, para comparar la primera etapa de adhesión celular de *L. monocytogenes* a la superficie, fueron de 24 horas, 48 horas y 72 horas. Los recuentos microbianos obtenidos, mediante el sistema de análisis de imágenes, mostraron

un mayor recuento en las primeras 48 horas de incubación, en comparación con las obtenidas después de una incubación de 24 horas y 72 horas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre estos tres períodos iniciales de incubación. En base a los recuentos obtenidos, el periodo de 48 horas fue considerado como la mejor condición para la incubación inicial.



**Figura 22.** Boxplot de los recuentos obtenidos en los diferentes períodos de incubación para la formación de biofilms de *L. monocytogenes*.

A nivel industrial, el hecho de mantener unas condiciones húmedas durante 48 horas, después del proceso de limpieza y desinfección, sobre todo al final de la semana, implica, de acuerdo con los resultados obtenidos, una situación óptima para favorecer la formación de biofilms salvajes de *L. monocytogenes*. Así, una higienización intensa el viernes por la noche, con un periodo de reposo durante el fin de semana (sábado y domingo) haría que la situación fuese verdaderamente preocupante, puesto que aumenta el riesgo, en relación a la capacidad de *L. monocytogenes* para crecer y adherirse a las superficies de

trabajo. Sin embargo, con los procedimientos diarios de limpieza y desinfección, el desarrollo del biofilm es más limitado.

Además, cuando se compararon los resultados obtenidos en el período de incubación inicial de 24 horas, con el lavado posterior y una nueva incubación de 24 horas más (24 h + 24 h), con el periodo total de 48 horas de incubación continua, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre ellos. El recuento mayor se observó después de una incubación continuada de 48 horas. Esto sugiere de nuevo que *L. monocytogenes* necesita un tiempo mínimo de 48 horas para asentarse, anclarse irreversiblemente a la superficie y comenzar a multiplicarse. Estos resultados están en concordancia con lo descrito por otros autores (Norwood y Gilmour 1999; Moltz y Martin 2005). En este sentido, Marsh *et al.* (2003) indicaron que, cuando la densidad microbiana en una superficie es baja, debido a un corto período de incubación, los pasos de lavado y renovación de medio de cultivo, en las superficies inoculadas, podrían alterar el patrón típico de las células adheridas en la misma, lo que a su vez conduciría a una menor carga microbiana. Cuando hay una alta densidad celular y, por consiguiente, más células firmemente adheridas a la superficie, como en los resultados obtenidos con el período de incubación inicial de 48 horas, los procesos de lavado y renovación de nutrientes no influirían significativamente en las estructuras microbianas de formación de biofilms ni en patrones tridimensionales. En los resultados obtenidos, cuando *L. monocytogenes* se incubó durante 72 horas seguidas, como período inicial, los recuentos microbianos disminuyeron respecto los recuentos obtenidos a las 48 h. Igualmente, se observó una ligera disminución en el porcentaje de supervivencia.

A parte del estudio para la determinación del periodo de incubación inicial más adecuado, se evaluaron también diferentes períodos de incubación post lavado. El crecimiento microbiano máximo encontrado, en las condiciones *in vitro* probadas, fue tras un periodo total de incubación de una semana (48 h + 24 h + 24 h + 72 h), con una cantidad total de células de 7,25 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,0009$ ) en comparación con el período total de incubación de 48 horas. Cuando las condiciones de incubación fueron de 48 horas + 24 horas, 48 horas + 48 horas y 48 horas + 24 horas + 24 horas, los recuentos obtenidos fueron entre 6,57 log (UFC cm<sup>-2</sup>) y 6,62 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Estas tres condiciones se compararon con un período total de incubación de 48 horas, encontrándose también diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$

en todos los casos). Estas tres condiciones (48 h + 24 h; 48 h + 48 h; 48 h + 24 h + 24 h) también se compararon entre sí y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,5392$ ;  $P = 0,55542$ ;  $P = 0,9965$ , respectivamente). Sin embargo, cuando estas tres condiciones se compararon con en el período de incubación de una semana, con los lavados establecidos, y la renovación de nutrientes, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los casos ( $P < 0,001$ ). En contraste, los resultados obtenidos en las condiciones de incubación de una semana y un día (es decir, 48 h + 24 h + 24 h + 72 h + 24 h), no demostraron tener diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,1654$ ), cuando se compararon con el período de incubación de una semana. No obstante, como tanto los recuentos microbianos, como el porcentaje de células viables, después del período de incubación de una semana (48 h + 24 h + 24 h + 72 h) fueron mayores que después del período de incubación de una semana más un día (48 h + 24 h + 24 h + 72 h + 24 h), se seleccionó el periodo total de incubación de una semana para establecerlo como las condiciones del modelo *in vitro* para producir biofilms de *L. monocytogenes*. Los resultados concuerdan con los expuestos por otros autores, que han indicado que extender el período de incubación a una semana hace que la organización del biofilm sea más compleja, con una mayor densidad en términos de número de células adheridas y una mayor producción de EPS (di Bonaventura *et al.* 2008; Centorame *et al.* 2017).

Adicionalmente, el porcentaje de supervivencia de los biofilms de *L. monocytogenes* se midió contando las células viables, frente a las células no viables, todas ellas formando parte del biofilm, con el objetivo de obtener la relación entre las células viables y las células totales (**Tabla 8**).

El porcentaje de células viables obtenidas osciló entre 86,27 % y 96,42 %, con el mayor porcentaje obtenido a las 48 horas de incubación. Tras las 48 horas de incubación, el número de células dañadas aumentó y, por consiguiente, el porcentaje de supervivencia de las células que conformaban el biofilm disminuyó, aunque no significativamente en ninguno de los casos ( $P > 0,05$ ). El hecho de que el recuento de células no viables aumente, a medida que se alarga el tiempo de incubación, indica que algunas de las células de *L. monocytogenes*, que conforman el biofilm, llegan a superar su propia curva de crecimiento exponencial, lo que ayuda a dar estructura al sistema y una nueva fuente de energía. Esto ha sido observado en la formación de biofilms de otros microorganismos,

por ejemplo, Asally *et al.* (2012) indicaron que las células de *Bacillus subtilis* no viables durante la formación de biofilms, dan lugar a fuerzas mecánicas que ayudan a generar estructuras tridimensionales complejas y concluyeron que, las células muertas constituían una respuesta de estrés a nivel comunitario, para mejorar la resistencia del biofilm a condiciones desfavorables del medio ambiente. Además, las células muertas se localizan preferentemente en las capas superficiales del biofilm, sin consumir sustrato, dejando que éste penetre en el interior del biofilm para alimentar a las capas de células más internas, ejerciendo un cierto papel protector contra posibles agentes antimicrobianos (Chambless *et al.* 2006).

**Tabla 8.** Porcentaje de supervivencia de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable con diferentes tiempos de incubación. Cada valor corresponde a una media de tres repeticiones realizadas en tres días separados (n = 9), calculándose a su vez la desviación estándar.

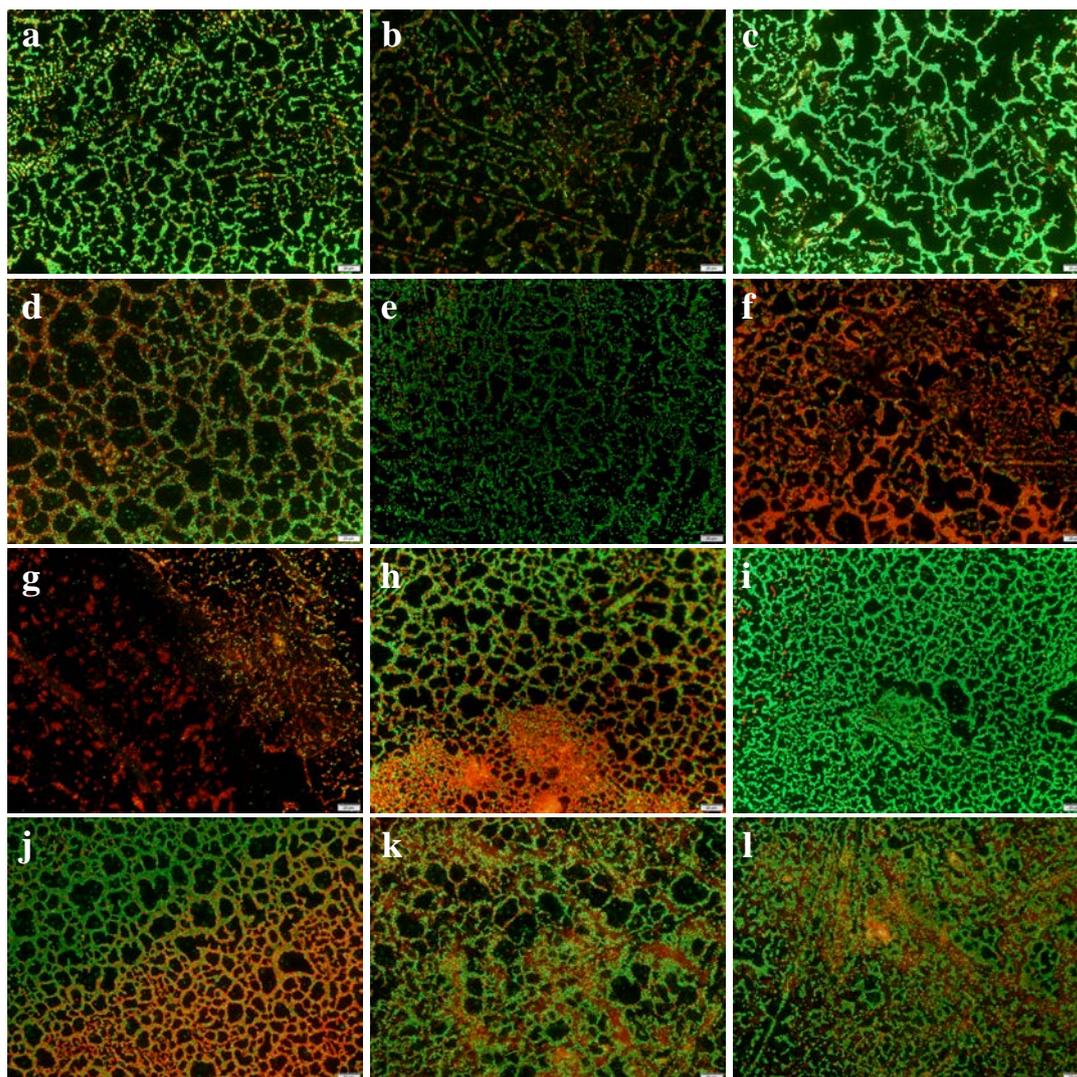
Periodos de incubación	% Supervivencia
24 h	95,43 ± 1,37
24 h + 24 h	93,9 ± 3,45
24 h + 48 h	89,8 ± 4,77
24 h + 72 h	95,15 ± 1,78
48 h	96,42 ± 1,97
48 h + 24 h	87,73 ± 6,68
48 h + 48 h	86,27 ± 4,22
48 h + 24 h + 24 h	94,75 ± 1,84
48 h + 24 h + 24 h + 72 h	94,47 ± 3,1
48 h + 24 h + 24 h + 72 h + 24 h	94,33 ± 2,11
72 h	94,81 ± 2,64
72 h + 24 h	96,17 ± 1,96

La formación de biofilms puede determinarse en función de la organización de las células que lo conforman, mediante la observación por DEM. Una disposición de células desagregadas indica que el biofilm no se ha formado, mientras que cuando las células comienzan a agregarse y a formar una red tridimensional, se puede suponer que un biofilm, con una estructura organizada e intacta, está empezando a establecerse (Chmielewski y Frank 2003).

Las imágenes tomadas por DEM no solo permiten observar la disposición de las células en las superficies, sino que también permiten determinar el tiempo requerido para generar

un biofilm maduro (**Figura 23**). En los resultados obtenidos, los períodos de incubación cortos revelaron una etapa inicial de crecimiento, con un patrón similar al de una red, pero manifestando aún agregados dispersos (**Figura 23 - a, b, c, e, f, g**). Estos no estaban lo suficientemente organizados o no eran robustos. Los resultados obtenidos fueron muy similares a las imágenes presentadas por Djordjevic *et al.* (2002), para demostrar la formación de biofilms de *L. monocytogenes* en PVC y acero inoxidable.

Después de un período de incubación de 48 horas + 24 horas + 24 horas, es decir un total de 4 días, el biofilm se estaba formando. Bajo estas condiciones, el biofilm generado parecía estar más agregado que el obtenido en períodos de incubación más cortos, también se observaron conglomerados de células y vacíos intersticiales. Además, bajo las condiciones de 24 horas + 72 horas y 72 horas + 24 horas, es decir un total de 4 días de incubación, de nuevo, pero con diferentes periodos iniciales y post lavado de incubación, se encontró una gran cantidad de bacterias adheridas a la superficie y agrupadas sólidamente. En todos los casos, se observaron huecos intersticiales, indicando que el patógeno necesita un mínimo de 4 días para formar una red de conglomerados celulares y pueda empezar a considerarse una estructura altamente organizada. Se ha sugerido que las áreas vacías, es decir, los huecos intersticiales, pueden representar canales de agua, que promueven la constante circulación de nutrientes y la eliminación de residuos (Costerton *et al.* 1995; Donlan y Costerton 2002), lo que a su vez podría considerarse como un indicador de madurez del biofilm generado.



**Figura 23.** Imágenes obtenidas por DEM de biofilms de *L. monocytogenes* CECT 935 teñidos con Live/Dead y formados después de las siguientes condiciones; (a) 24 h; (b) 24 h + 24 h; (c) 24 h + 48 h; (d) 24 h + 72 h; (e) 48 h; (f) 48 h + 24 h; (g) 48 h + 48 h; (h) 48 h + 24 h + 24 h; (i) 48 h + 24 h + 24 h + 72 h; (j) 48 h + 24 h + 24 h + 72 h + 24 h; (k) 72 h; 72 h + 24 h. Ampliación 20X.

A medida que el período de incubación se alargó, los biofilms producidos por *L. monocytogenes* se organizaron en estructuras similares a los panales de abejas. Este tipo de estructuras comenzaron a ser evidentes después de las 48 horas + 24 horas + 24 horas tal y como muestra la **Figura 23-h**, pero tuvieron una mayor consolidación cuando el período de incubación se extendió a una semana, con la serie de lavados y renovación de medio de cultivo (48 h + 24 h + 24 h + 72 h). Estas estructuras tipo panal, como morfotipo en biofilms de *L. monocytogenes*, se han descrito anteriormente tan solo dos veces (Marsh *et al.* 2003; Guilbaud *et al.* 2015). Consisten en capas de células cohesivas consolidadas,

en una red tridimensional, con huecos intersticiales incluidos. El modelo de incubación de una semana con una serie de lavados y renovación de medio de cultivo propuesto en este estudio, se puede considerar como un modelo robusto, puesto que se obtiene una gran cantidad de células adheridas a la superficie, estructuras conglomeradas complejas y vacíos intersticiales, lo que lo hace interesante para posteriormente emplearlos como modelo de estudio. En consecuencia, pueden ser reproducidos, para evaluar sistemas de limpieza, desinfección o tratamientos integrados, que permitan desarrollar productos específicos y eficaces para su eliminación. Esto permitiría generar biofilms a escala de laboratorio, consiguiendo así un resultado más real.

Las condiciones experimentales empleadas en este estudio fueron una temperatura y un medio de cultivo óptimos para el desarrollo de biofilms de *L. monocytogenes*, que difieren enormemente de los entornos de preocupación de la industria alimentaria. Sin embargo, el objetivo fue generar biofilms con el tiempo mínimo requerido para que éstos maduren en condiciones *in vitro* y así, posteriormente, poder reproducirlos y crear estrategias específicas para la limpieza y la desinfección en la industria alimentaria. Aunque los biofilms de *L. monocytogenes* no se formaron en condiciones similares a la industria alimentaria, el modelo propuesto produce biofilms en su etapa madura en el período mínimo requerido, lo que lo hace más realista para investigar estrategias de control, que los modelos que existen actualmente.

Otros autores han desarrollado previamente modelos de formación *in vitro* de biofilms de *L. monocytogenes*. Kalmokoff *et al.* (2001) desarrollaron un modelo utilizando acero inoxidable como superficie de contacto con alimentos y con un período total de incubación de 72 horas. Los resultados no pudieron superar el recuento microbiano de 5 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Además, cuando se utilizó SEM en el mismo estudio, para observar si había una matriz que protegía a las bacterias adheridas, los resultados no fueron satisfactorios. Otro ejemplo sería el estudio llevado a cabo por Zameer *et al.* (2010), quienes desarrollaron un modelo específico para la cepa *L. monocytogenes* EDG-e en poliestireno, aunque empleando la absorbancia como medida de recuento y, por consiguiente, mostrando los resultados estimados de cuantificación. De Oliveira (2010), mediante el uso de un modelo experimental, basado en la circulación constante de medio de cultivo sobre superficies de acero inoxidable, adheridas a un soporte, describieron una

concentración de 5,64 log (UFC cm<sup>-2</sup>), después de 240 h seguidas de incubación. Estos valores están lejos de los observados en el presente estudio.

### 2.3. Formación de biofilms de *L. innocua* vs *L. monocytogenes*

Se evaluó la influencia de los periodos de incubación inicial y post lavado en la formación de biofilms de *L. innocua* para, no sólo establecer bajo qué condiciones se generaban mejor estas estructuras, sino también para determinar si, el modelo para la producción *in vitro* de biofilms maduros, se diferencia entre especies. La **Tabla 9** muestra los recuentos obtenidos de *L. innocua* bajo los distintos periodos de incubación inicial y post lavado. En base a los recuentos obtenidos y al % de supervivencia, se determinó, de nuevo, que las condiciones experimentales más adecuadas para la formación *in vitro* de biofilms maduros fueron las del periodo de incubación de una semana (48 h + 24 h + 24 h + 72 h). Algo a destacar es que, a medida que el periodo inicial de incubación se alargaba, el recuento total aumentó: 6,68 log (UFC cm<sup>-2</sup>), 6,72 log (UFC cm<sup>-2</sup>) y 6,95 log (UFC cm<sup>-2</sup>) para 24 h, 48 h, y 72 h respectivamente. No obstante, el porcentaje de supervivencia disminuyó (97,13 %, 80,83 %, 64,47 % para 24 h, 48 h, y 72 h respectivamente). Esto se debe a que, a medida que aumenta el tiempo de incubación, aumentan las células no viables, que tal y como se ha comentado anteriormente, podrían dar robustez al sistema.

Diferentes estudios han concluido que *L. innocua* es más persistente que *L. monocytogenes* en las superficies de la industria alimentaria (Aguado *et al.* 2004; Thimothe *et al.* 2004). Estas dos bacterias son genéticamente muy cercanas y tienden a competir por los mismos hábitats y recursos (Norwood y Gilmour 2001; Milillo *et al.* 2012), por lo que comprender esta relación competitiva entre los dos microorganismos es importante, no solo porque puede servir como posible microorganismo sustituto para estudiar la formación de biofilms a escala de laboratorio, sino que también porque la detección de *L. innocua* en productos alimenticios puede producir falsos positivos para *L. monocytogenes* (Koo *et al.* 2011).

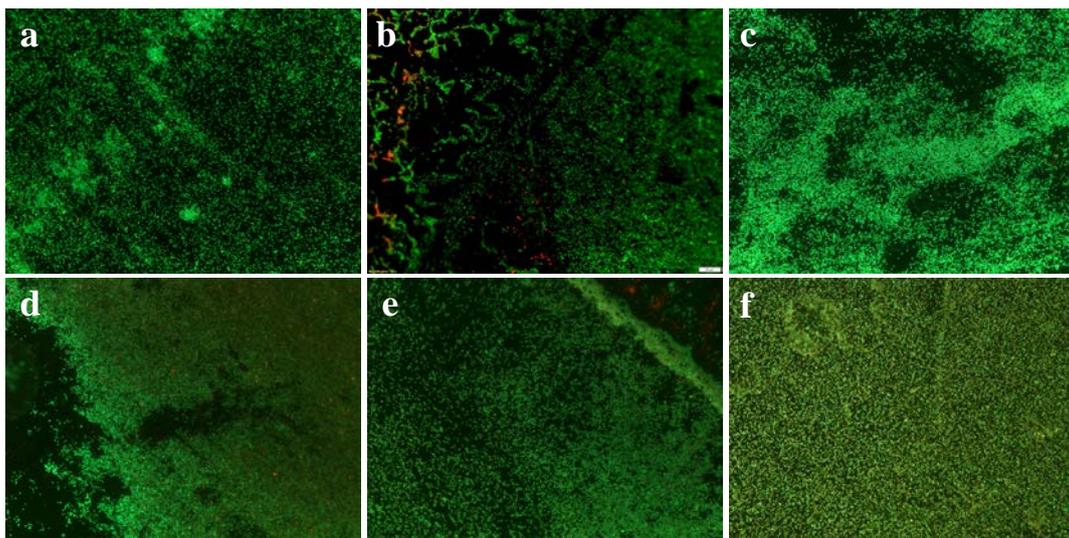
**Tabla 9.** Recuentos y porcentaje de supervivencia obtenidos en los diferentes períodos de incubación para la formación de biofilms maduros de *L. innocua*. Cada valor corresponde a una media de tres repeticiones realizadas en tres días separados ( $n = 9$ ), calculándose a su vez la desviación estándar.

Tiempo de incubación			
Periodo de incubación inicial	Periodo de incubación post lavado	Recuento total (Log (UFC cm <sup>-2</sup> ))	% supervivencia
24 h	+ 0 h	6,68 ± 0,03	97,13 ± 2,69
	+ 24 h	6,71 ± 0,07	95,17 ± 3,36
	+ 48 h	7,16 ± 0,05	92,35 ± 0,89
	+ 72 h	7,21 ± 0,06	97,30 ± 1,40
48 h	+ 0 h	6,72 ± 0,47	80,83 ± 12,85
	+ 24 h	6,98 ± 0,24	88,96 ± 9,12
	+ 48 h	6,92 ± 0,26	97,32 ± 0,24
	+ 24 h + 24 h	6,91 ± 0,25	70,67 ± 24,27
	+ 24 h + 24 h + 72 h	7,32 ± 0,02	93,51 ± 1,03
	+ 24 h + 24 h + 72 h + 24 h	7,25 ± 0,05	73,96 ± 2,19
72 h	+ 0 h	6,95 ± 0,10	64,47 ± 34,17
	+ 24 h	7,06 ± 0,03	93,27 ± 4,90

En la **Figura 24** se muestran diferentes imágenes, tomadas mediante DEM, donde se observa la disposición de las células en las superficies empleadas en el estudio. El biofilm creado, después de una incubación total de una semana, no se aprecia tan disgregado como el obtenido en tiempos inferiores. Se observa una mayor densidad, conglomerados de células y agrupaciones tridimensionales. No se detecta la existencia de huecos intersticiales, a diferencia de los biofilms obtenidos por *L. monocytogenes*.

Cuando estas dos bacterias se desarrollan conjuntamente, *L. innocua* ha demostrado ser la que mayor capacidad de adherencia y formación de biofilm presenta (Koo *et al.* 2014). Esto puede ser debido a que poseen una superficie celular más electronegativa, lo que favorece la adhesión inicial de las células (Meylheuc *et al.* 2002), y a su mayor eficiencia en la utilización de recursos (Zitz *et al.* 2011). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre ambos microorganismos en las condiciones establecidas como modelo de formación de biofilms maduros (48 h + 24 h + 24 h + 72). En línea con observaciones de otros autores, cuando los dos microorganismos crecen como biofilm de una sola especie, por separado, tienden a comportarse de manera similar, exhibiendo patrones de crecimiento relacionados y valores cercanos de formación de biofilm (Koo *et al.* 2014). Esto sugiere que los modelos individuales pueden dar una imagen sesgada, puesto que estos microorganismos podrían dar resultados similares al estudiarse por separado, como de hecho se ha puesto de manifiesto. No obstante, en

condiciones naturales los biofilms son mixtos, donde se podrían encontrar varias especies del género *Listeria* creciendo a la vez y junto a microorganismos no relacionados. Por tanto, será necesario desarrollar protocolos que permitan evaluar al patógeno en condiciones similares a las que se obtienen en la industria alimentaria. En este caso, el empleo de sensores de superficie puede jugar un papel especialmente interesante.



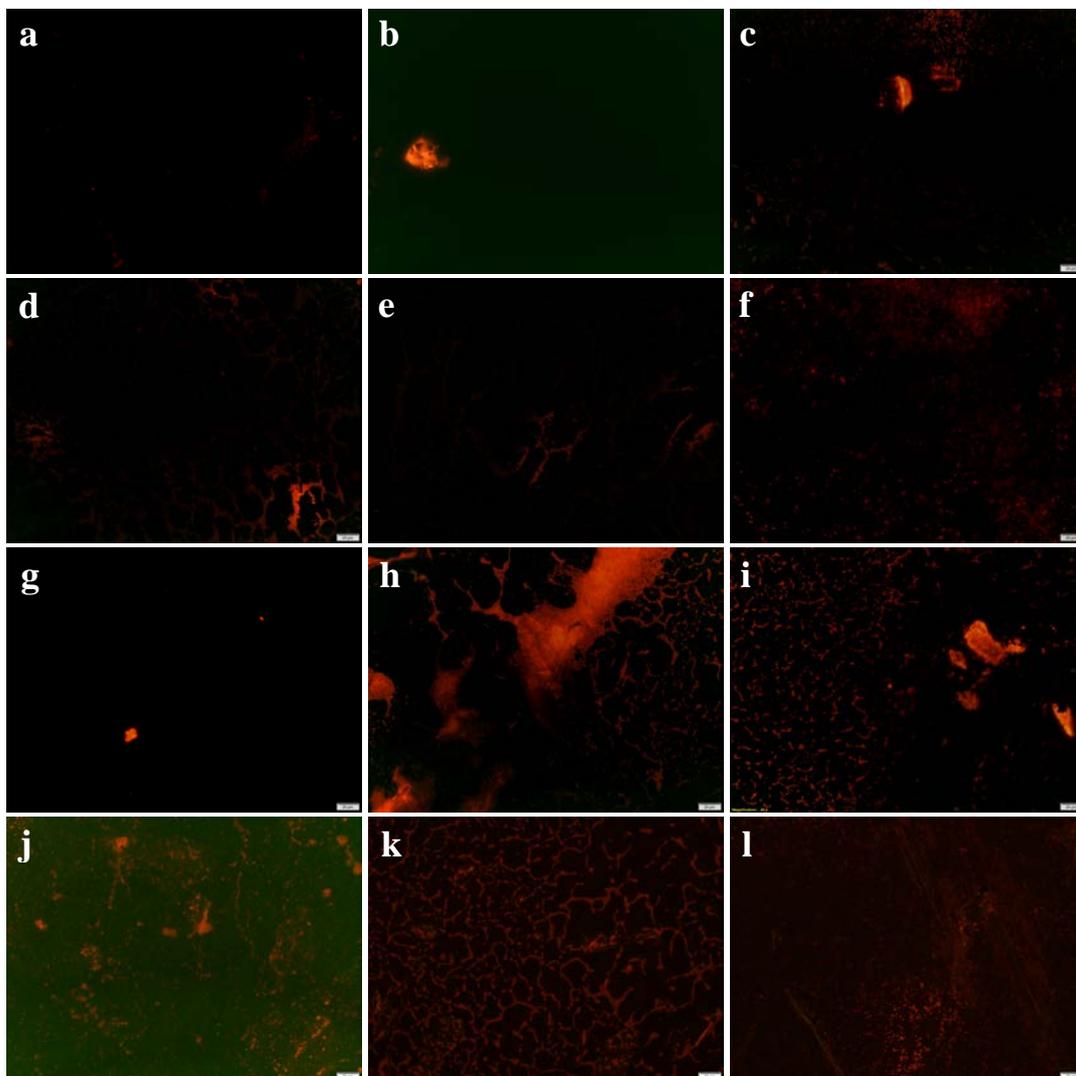
**Figura 24.** Imágenes obtenidas por DEM de biofilms de *L. innocua* CECT 910 teñidos con Live/Dead y formados después de las siguientes condiciones; (a) 24 h, (b) 24 + 48 h, (c) 48 + 24 h, (d) 48 + 24 + 24 h, (e) 48 + 24 + 24 + 72 h, (f) 48 + 24 + 24 + 72 + 24 h. Ampliación 20X.

#### 2.4. Producción de ECM durante los distintos períodos de incubación

La producción de ECM, que ayuda a componer y estructurar el biofilm, fue evaluada, durante los distintos periodos de incubación, mediante DEM. Los ECM son uno de los principales elementos presentes en los biofilms pero, al mismo tiempo, presentan un gran desafío en su estudio, debido a la gran cantidad y heterogeneidad de biopolímeros y otras sustancias que presentan (Colagiorgi *et al.* 2016). Por ello se realizaron dos estudios cualitativos, para evaluar la matriz del biofilm, generada por *L. monocytogenes* durante los distintos tiempos de incubación.

En primer lugar, a las superficies bajo estudio, se les aplicó una tinción específica de la matriz de los biofilms (**Figura 25**). Ésta consigue teñir la mayor parte de las proteínas,

incluidas las glicoproteínas, fosfoproteínas, lipoproteínas, proteínas de unión a calcio y proteínas fibrilares. Por ello ha sido ampliamente empleada, con este fin, en varios estudios (Frank y Patel 2007; Dapa *et al.* 2013; Sanchez *et al.* 2013).



**Figura 25.** Imágenes obtenidas por DEM de la matriz de biofilms de *L. monocytogenes* CECT 935 teñidos con SYPRO Ruby Biofilm Matrix Stain y formados después de las siguientes condiciones; (a) 24 h; (b) 24 h + 24 h; (c) 24 h + 48 h; (d) 24 h + 72 h; (e) 48 h; (f) 48 h + 24 h; (g) 48 h + 48 h; (h) 48 h + 24 h + 24 h; (i) 48 h + 24 h + 24 h + 72 h; (j) 48 h + 24 h + 24 h + 72 h + 24 h; (k) 72 h; 72 h + 24 h. Ampliación 20X.

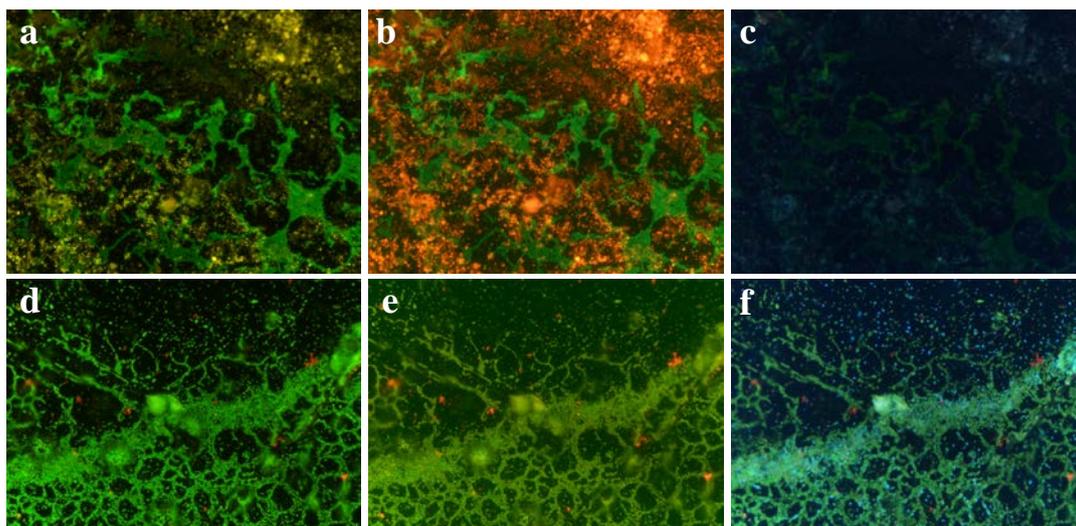
Los resultados obtenidos mostraron que, a medida que el período de incubación se alargaba, se producían una mayor proporción de sustancias proteicas que podrían dar consistencia a la matriz. En concordancia con los resultados previamente descritos, en la

evaluación de los diferentes periodos de incubación y la formación de biofilms de *L. monocytogenes*, las condiciones bajo las cuales se podría considerar que el biofilm comienza a formarse es cuando se emplea un período de incubación de 48 horas + 24 horas + 24 horas (**Figura 25-h**) con sus respectivos lavados y renovación de nutriente. Es a partir de este momento cuando hay una cantidad considerablemente más alta de sustancias proteicas, que respecto a períodos de incubación más cortos. No obstante, las condiciones de incubación que demostraron un mayor porcentaje de superficie cubierta, un ECM más endurecido y una cierta madurez del biofilm, fueron las correspondientes al ciclo de 7 días (**Figura 25-i**; 48 h + 24 h + 24 h + 72 h).

Hefford *et al.* (2005) utilizando esta tinción, determinaron diecinueve tipos de proteínas en biofilms generados tras 5 días de incubación. Éstas fueron identificadas mediante espectrometría de masas - MALDI-TOF. Entre ellas destacaron CodY y PGAM, que han sido previamente descritas como proteínas altamente expresadas en biofilms de *L. monocytogenes* (Helloin *et al.* 2003).

No obstante, la composición de la matriz extracelular no está compuesta sólo por proteínas, sino por un conjunto de sustancias que confieren complejidad al sistema. Para ello se hace necesario determinar su distribución y composición. En este trabajo se planteó la posibilidad de observar los diferentes componentes que conformaban la matriz de los biofilms, producidos por *L. monocytogenes*. Con este objetivo las muestras se tiñeron con una mezcla de colorantes fluorescentes que contenía ConA, FITC y AN por una parte, y ConA, FITC y DAPI, por la otra. Las muestras se evaluaron posteriormente mediante DEM y LSCM.

El empleo de estos colorantes fluorescentes, para teñir los biofilms y su evaluación posterior por DEM, permitieron observar simultáneamente diferentes componentes de la matriz, su localización y la interacción que puede existir entre ellos (**Figura 26**). Las imágenes obtenidas muestran que, con el modelo *in vitro* propuesto, incubando una semana y con los lavados y renovación de nutrientes intermedios (48 h + 24 h + 24 h + 72 h), se generaba una proporción importante de proteínas y carbohidratos, que conferirían una matriz robusta. No obstante, esta matriz no es nada homogénea y los diferentes componentes de la misma tienen una distribución variable.



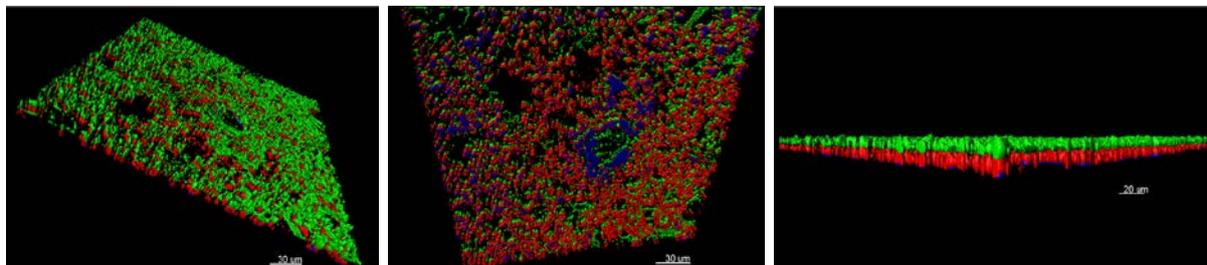
**Figura 26.** Imágenes obtenidas por DEM tras la evaluación de la matriz extracelular de biofilms de *L. monocytogenes*. Los biofilms se realizaron en superficies de acero inoxidable y se incubaron durante una semana (48 h + 24 h + 24 h + 72 h, condiciones previamente seleccionadas para el modelo *in vitro* de formación de biofilms de *L. monocytogenes*). (a, b, c) mezcla con los fluorocromos FITC, ConA y AN; (d, e, f) mezcla con los fluorocromos FITC, ConA y DAPI. Ampliación 20X. Las imágenes muestran (a, d) el filtro empleado para FITC, (b, e) el filtro empleado para ConA, (c, f) el filtro empleado para AN y DAPI.

Las proteínas se encuentran en la masa del biofilm, mezcladas con componentes glucídicos, entre los que estarán glicoproteínas y mucopolisacáridos, generados por los microorganismos residentes. Sin embargo, en la superficie, parece haber una dominancia de la presencia de proteínas. Los lípidos aparecen como un componente minoritario, junto con restos de ADN y otro material genético, que presentan una distribución dispersa en toda la matriz. Esto ha de servir para evaluar los componentes principales a los que hay que atacar mediante estrategias de limpieza y desinfección, que permitan el desarrollo de productos específicos y eficaces.

### 2.5. *Análisis morfológico y topográfico de los biofilms producidos por L. monocytogenes*

Una vez probadas diferentes mezclas de colorantes, con el objetivo de poder observar la morfología superficial, las muestras se analizaron mediante CLSM, donde se pudieron recoger grupos de microfotografías a distinta profundidad, generando un modelo 3D

mediante un software especializado en análisis de imagen. Esto permite visualizar las distintas capas de la matriz y entender la magnitud del problema a solucionar (**Figura 27**).



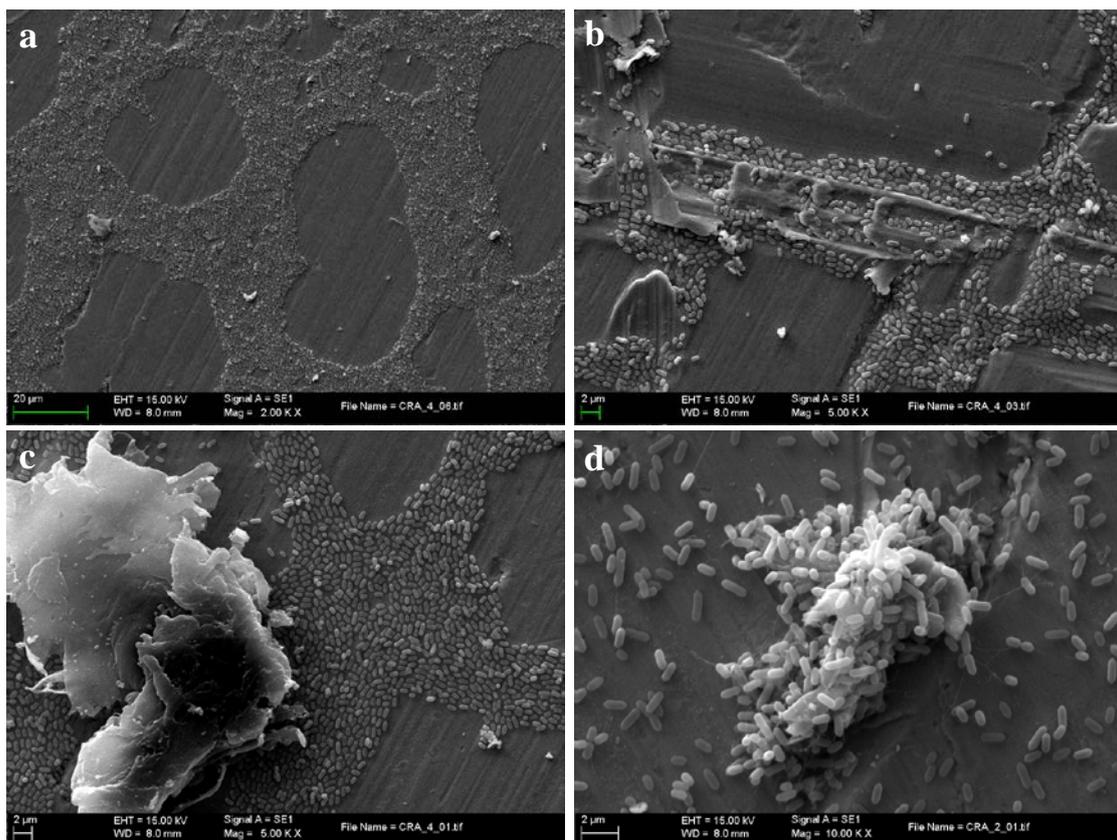
**Figura 27.** Representación 3D del modelo de formación de biofilms realizado para *L. monocytogenes* después del análisis de las microfotografías obtenidas por CLSM de las diferentes partes del biofilms. En verde se marcan las proteínas, en rojo los azúcares y en azul el ADN.

En la última década, los componentes estructurales que conforman la matriz de biofilms de *L. monocytogenes* han sido ampliamente investigados. Contrariamente a lo que había sido asumido, la matriz que rodea a los biofilms está compuesto por más elementos que sólo EPS. De hecho, estos componentes son regularmente una parte constitutiva menor de los ECM, aunque sean muy importantes (Flemming *et al.* 2007). Brauge *et al.* (2016) observaron que, uno de los carbohidratos principales de los biofilms de *L. monocytogenes*, son los ácidos teicoicos (AT) y que éstos tenían su origen en la propia pared celular de la bacteria. En su estudio, demostraron también, que un mutante de *L. monocytogenes* en el gen que codifica para la glicosilación de los AT, presentó un polisacárido extracelular igual al polisacárido que presentaba en la pared celular, sugiriendo que los carbohidratos, dentro de la matriz de los biofilms, tienen un origen atribuible, presumiblemente, al desprendimiento de la pared celular y a su autólisis. Dentro de la matriz de biofilms de *L. monocytogenes*, los componentes más abundantes son las proteínas extracelulares (Combrouse *et al.* 2013). De hecho, se ha demostrado que tratar a biofilms de *L. monocytogenes* con proteasa daña el desarrollo de estas estructuras o produce una dispersión celular (Longhi *et al.* 2008). Esto sugiere un importante papel de las proteínas como constituyentes en la matriz.

Los resultados obtenidos en el presente estudio reflejan que la matriz está compuesta, en cantidad apreciable, por proteínas y glicoproteínas, lo que confirma la observación de estos autores. Se aprecian una gran cantidad de proteínas en la matriz y en la superficie. Por tanto, un tratamiento con enzimas específicas debería permitir un control en el proceso de acondicionamiento del patógeno en superficies industriales.

La topografía de los biofilms formados por *L. monocytogenes* sobre las superficies de acero inoxidable, utilizando SEM (**Figura 28**), mostró conglomerados de células dispuestas en estructuras similares a panales de abejas (**Figura 28-a**) como previamente se mostró en las imágenes obtenidas por DEM. Se observó, en repetidas ocasiones, que las células donde mayormente conformaban estas estructuras se encontraban generalmente en las grietas de las superficies de acero inoxidable (**Figura 28-b**). En este sentido, el material y el acabado de la superficie juegan un papel fundamental en su condición higiénica. Mosquera-Fernández *et al.* (2014) demostraron que la formación de biofilms de *L. monocytogenes* estaba directamente influenciada por el tipo de superficie y material que se empleaba. Concretamente, en su estudio, utilizaron acero inoxidable AISI 304 y AISI 316. Las superficies de acero inoxidable AISI 304, su acabado suele caracterizarse por límites granulosos, con algunas hendiduras cóncavas las que se pueden considerar grietas, debido al tratamiento de decapado al que se somete, y AISI 316, su acabado suele caracterizarse por tener grietas lisas y más superficiales. Los autores demostraron que las superficies AISI 304, al tener hendiduras profundas debido al decapado, promovían el atrapamiento de células en las primeras etapas de la formación de biofilms, y lo atribuyeron, en parte, a que se aumentaba la energía de enlace causada por el aumento del área de contacto entre el microorganismo y la superficie.

Además, también es importante resaltar que en la **Figura 28-c**, hay una estructura que cubre una parte importante de las células, que constituiría parte de la matriz, por estar superpuesta a las bacterias adheridas a la superficie. En la **Figura 28-d** se pueden ver las superficies a más aumentos, de manera que se puede apreciar la producción de cierto limo en forma hilada, que actúa como enganche, y generación de matriz.



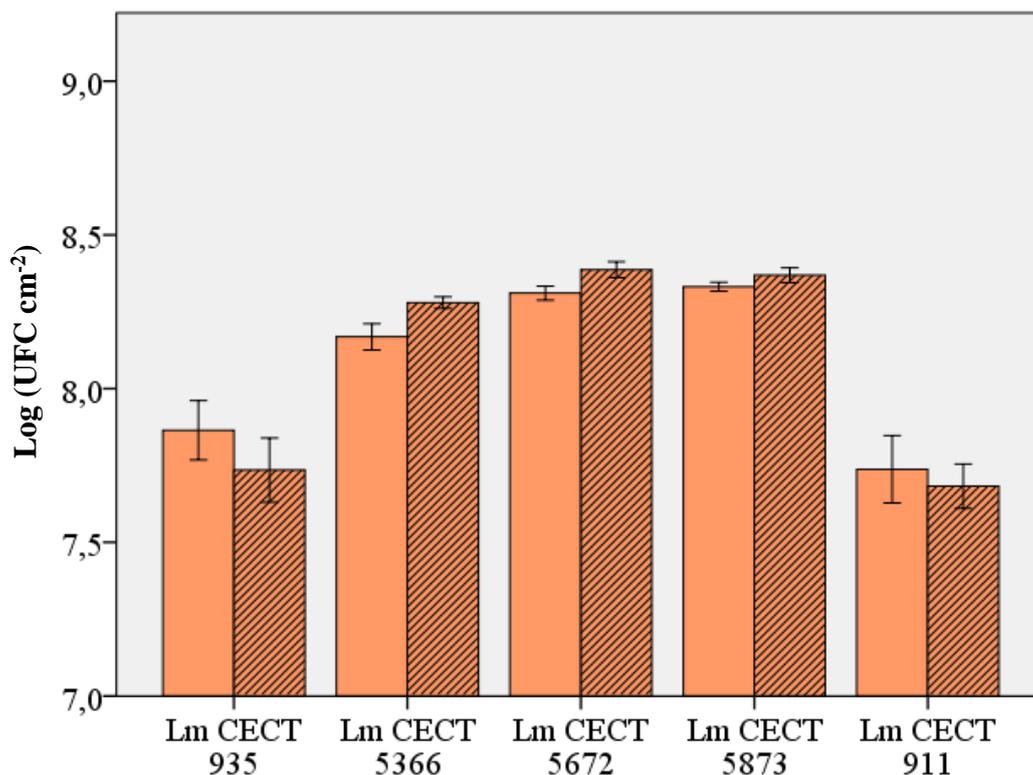
**Figura 28.** Imágenes obtenidas por SEM de biofilms formados por *L. monocytogenes* CECT 935; (a) Amplificación 20X; (b, c) Amplificación 5,00K X; (d) Amplificación 10,00K X.

A menudo, en determinadas áreas superficiales se pueden observar biofilms maduros que cubren un cierto porcentaje de la superficie, mientras que en otras zonas la estructura aún se está desarrollando, tal y como se ha indicado en previos estudios (Marsh *et al.* 2003). Las zonas de la superficie cubiertas por biofilms maduros de *L. monocytogenes* mostraron estructuras tales como panales de abejas, con células apiladas entre ellas, alrededor del perímetro de los agujeros vacíos, con cierto polímero fibroso que aparentemente anclaba las células en sus posiciones. Como se ha discutido anteriormente, se ha sugerido que este tipo de arquitectura celular, que incluye agujeros vacíos, sirva como canales para el transporte de agua, nutrientes y residuos.

## 2.6. Efecto de una capa de recubrimiento proteico en superficies sobre la formación de biofilms de *L. monocytogenes*

Se estudió el impacto que puede tener una capa proteica acondicionada, en superficies de acero inoxidable y poliestireno, sobre la formación de biofilms de cinco cepas diferentes de *L. monocytogenes*. Se trató de un estudio preliminar, con el objetivo de desarrollar un sistema modelo para simular condiciones de suciedad y así, en estudios futuros, crear estrategias específicas para su limpieza y desinfección.

El efecto del recubrimiento proteico sobre la formación de biofilms, en superficies de poliestireno, se evaluó mediante el ensayo cristal violeta (**Figura 29**).



**Figura 29.** Recuento Log (UFC cm<sup>-2</sup>) obtenido a partir de los valores OD<sub>595</sub> de cinco cepas diferentes de *L. monocytogenes* (Lm) incubadas una semana (48 h + 24 h + 24 h + 72 h) estáticamente a 30 °C en (■) poliestireno, (▨) poliestireno con una capa proteica acondicionadora.

El mayor recuento obtenido fue para la cepa *L. monocytogenes* CECT 5672 con 8,39 log (UFC cm<sup>-2</sup>), cuando ésta creció sobre las superficies con la capa proteica. Se calcularon las diferencias entre las superficies que tenían la capa de proteína acondicionada y las superficies que no la tenían y se observó que *L. monocytogenes* CECT 5366, 5672 y 5873 mostraron entre un 8-13 % más biomasa adherida, cuando los residuos proteicos estaban presentes en las superficies de poliestireno. No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) en los recuentos microbianos.

Para la evaluación de la producción de biofilms sobre acero inoxidable se empleó DEM. En este caso, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre los recuentos microbianos obtenidos en las superficies que tenían la capa de proteína acondicionada y las que no lo tenían. Además, en concordancia con los resultados obtenidos en poliestireno, se demostró que *L. monocytogenes* CECT 5672 fue la cepa más productora de biofilms.

La expresión de proteínas propias, como las porinas, por parte de las células que conforman los biofilms, ayudan a mejorar la adherencia microbiana y el transporte extracelular (Garrett *et al.* 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos indican que la solución proteica aplicada, sobre las superficies de poliestireno y acero inoxidable, no fue un factor que interviniera en la adherencia de las células, ya que se obtuvo una proporción similar de células, en las superficies que tenían la capa de proteína acondicionada, y en las que no fueron tratadas. Hingston (2013) investigó el impacto de los niveles iniciales de residuos orgánicos, la presencia de sal y alimentos grasos, en la supervivencia *L. monocytogenes* a la desecación, cuando forma biofilms en superficies de acero inoxidable. Este autor demostró que las capas acondicionadoras, que contienen compuestos orgánicos, tienen un efecto importante sobre las tasas de supervivencia a la desecación de este patógeno dentro del biofilm, lo que indica que estos residuos podrían ejercer cierta protección a las células que lo conforman, así como también dar robustez al sistema. En cualquier caso, nada que se haya podido corroborar en el presente estudio.

La acumulación de residuos orgánicos e inorgánicos, en los ambientes de procesado de alimentos, puede actuar como capa de acondicionamiento, lo que aumenta los niveles de nutrientes y favorece la formación de biofilms. Los resultados obtenidos en ambos materiales no muestran una diferencia clara, en cuanto a la formación de biofilms de este

patógeno, lo que no está en concordancia con estudios publicados donde se ha visto el papel clave que juega este tipo de residuos en la estimulación a la adhesión y posterior generación de biofilms (Donlan y Costerton 2002; Lorite *et al.* 2011).

Esto podría sugerir que la capa acondicionadora no se formó de manera correcta o que es necesaria una suciedad más compleja, que pueda condicionar los niveles de contaminación en la superficie. Esto abre la vía a una investigación futura sobre el impacto que tiene este tipo de residuos en el desarrollo de biofilms, con un mayor grado de profundidad. En este caso, se deberían simular condiciones reales que se encuentran en la propia industria y así poder desarrollar, no sólo un modelo para formar biofilms *in vitro*, sino también para crearlo en las condiciones más parecidas a las reales. Esto permitiría evaluar la eficacia real de los diferentes productos de limpieza y desinfección que se comercializan en la actualidad.

**VI. Detección y cuantificación de biofilms maduros de *Listeria monocytogenes*. Una comparación de diferentes métodos.**



## 1. Materiales y métodos

### 1.1. Superficies de estudio

Se emplearon discos de acero inoxidable AISI 316 con grado 2B de 2 cm de diámetro y 1 mm de grosor. Justo antes de ser empleados, los discos fueron sometidos a procedimientos de limpieza y desinfección tal y como indica la norma europea UNE-EN 13697:2015 (descrito en Capítulo V sección 1.1). Con el objetivo de garantizar que los discos de acero inoxidable estuvieran completamente estériles, se autoclavaron a 121 °C durante 15 minutos, como paso previo a la inoculación bacteriana.

### 1.2. Cepas bacterianas

Es este estudio se utilizaron un total de diecisiete cepas de *L. monocytogenes* (**Tabla 10**), obtenidas de (i) la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Paterna, España), (ii) diferentes estudios realizados en la planta procesadora de cerdo Ibérico bajo estudio (López *et al.* 2007; López *et al.* 2008; López *et al.* 2013; Ortiz *et al.* 2014b; Ortiz *et al.* 2016). Estas cepas se seleccionaron en base a poder comparar el comportamiento de distintos serotipos y linajes, así como también cepas de referencia y salvajes de *L. monocytogenes*. Los procedimientos para aislamiento, identificación y serotipado de algunas de las cepas fueron previamente descritos por Ortiz *et al.* (2014a).

Las cepas liofilizadas almacenadas a 4 °C, se recuperaron en TSB a 30 °C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las cepas se sembraron por agotamiento en TSA y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. A partir del cultivo, se resembraron colonias aisladas en tubos inclinados de TSA con el fin de obtener cultivos stock. Éstos se incubaron a 37 °C durante 24 horas y posteriormente se almacenaron a una temperatura de 4 °C durante un periodo máximo de un mes.

**Tabla 10.** Cepas de *L. monocytogenes* utilizadas en este estudio.

Cepa	Serotipo	Origen*
<b>5366</b>	4b	CECT
<b>5672</b>	4b	CECT
<b>5873</b>	1/2a	CECT
<b>911</b>	1/2c	CECT
<b>935</b>	4b	CECT
<b>A7</b>	1/2a	López <i>et al.</i> (2008)
<b>P12</b>	1/2a	López <i>et al.</i> (2007)
<b>R6</b>	1/2a	López <i>et al.</i> (2013)
<b>S1(R)</b>	1/2a	Ortiz <i>et al.</i> (2014b)
<b>S1(S)</b>	1/2a	Ortiz <i>et al.</i> (2014b)
<b>S2-1</b>	1/2a	Ortiz <i>et al.</i> (2014b)
<b>S2-bac</b>	1/2a	Ortiz <i>et al.</i> (2014b)
<b>4423</b>	1/2a	Ortiz <i>et al.</i> (2016)
<b>CDL69</b>	1/2a	Ortiz <i>et al.</i> (2016)
<b>EGD-e</b>	1/2a	Ortiz <i>et al.</i> , (2016)
<b>S10-1</b>	2a	Ortiz <i>et al.</i> (2016)
<b>S2-2</b>	1/2a	Ortiz <i>et al.</i> (2016)

\*CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). De López *et al.* (2007), López *et al.* (2008), López *et al.* (2013), Ortiz *et al.* (2014b), Ortiz *et al.* (2016), las cepas fueron aisladas y recolectadas durante diferentes estudios en una planta procesadora de cerdo ibérico.

### 1.3. Preparación del inóculo y formación de biofilms en discos de acero inoxidable

El inóculo se preparó cultivando las diferentes cepas de *L. monocytogenes* en TSA a 37 °C durante 24 horas. A partir de aquí, se transfirieron varias colonias aisladas al caldo de cultivo TSYEB<sub>gluc1%</sub> + NaCl<sub>2%</sub> hasta llegar a una turbidez de 0,1 Unidades McFarland, que equivale aproximadamente a 10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. La suspensión bacteriana se diluyó decimalmente en TSS y se determinó la concentración inicial mediante el sistema TEMPO.

La formación de biofilms de *L. monocytogenes* se llevó a cabo inoculando 30 µl de cada suspensión, que contenían las distintas cepas, en el centro de cada disco, resultando en una concentración en superficie aproximada de 5,5 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Los discos se colocaron en placas de Petri estériles, posteriormente se introdujeron en una cámara húmeda y se incubaron a 30 °C, con el mismo objetivo comentado anteriormente, que fue promover el crecimiento bacteriano y la consecuente formación de biofilms, bajo condiciones húmedas (Fuster-Valls *et al.* 2008). Los biofilms se formaron en condiciones estáticas con un período total de incubación de una semana, con una serie de pasos de lavado y renovación de nutrientes, mediante la adición de más medio de cultivo. Estos pasos se realizaron a las 48 horas + 24 horas + 24 horas + 72 horas, ya que se observó que fueron las óptimas para la formación de biofilms de *L. monocytogenes*. La renovación del medio de cultivo se realizó lavando los discos inoculados con 3 ml de agua destilada estéril por duplicado y añadiendo 30 µl de TSYEB<sub>gluc1%+NaCl2%</sub>, para mejorar el crecimiento de las células adheridas y promover la formación de biofilms. Los discos de acero inoxidable se colocaron de nuevo bajo las condiciones experimentales establecidas.

#### **1.4. Cuantificación de biofilms por DEM**

Una vez transcurrido el periodo de incubación, los biofilms formados en las superficies se lavaron por duplicado con 3 ml de agua destilada estéril, para descartar las células no adheridas y, a continuación, se tiñeron con 5 µl del kit de viabilidad bacteriana Live/Dead BacLight y se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Las superficies se evaluaron por DEM y se tomaron diferentes fotografías, en distintos campos, para realizar una cuantificación posterior y poder estimar el número de células por centímetro cuadrado. El análisis de las imágenes se hizo como se estableció en el Capítulo V sección 1.5.

### **1.5. Cuantificación de biofilms mediante cultivo convencional, TEMPO, VIDAS y qPCR**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las superficies se lavaron por duplicado con 3 ml de agua destilada estéril, con el objetivo de descartar las células no adheridas, y a continuación, se colocaron en un frasco estéril que contenía perlas de vidrio y 10 ml de solución neutralizante [1 g de triptona, 8,5 g de NaCl, 30 g de Tween 80 y 1.000 ml de agua desionizada (pH  $7,0 \pm 0,2$ )]. Una vez introducidas las muestras en los frascos, éstos se agitaron en vórtex durante 1,30 minutos a 40 Hz, para desprender las células adheridas de la superficie y así poder cuantificarlas. Este modelo de recuperación bacteriana se escogió en base a haber demostrado tener una alta eficiencia de recuperación de células adheridas en superficie tal y como se encuentra indicado por la UNE-EN 13697 (AENOR 2015) y por autores tales como Fontecha-Umaña (2014) y Ríos-Castillo *et al.* (2017).

En el caso del cultivo convencional (recuento en placa) y sistema TEMPO, la suspensión resultante se diluyó decimalmente en TSS y 1 ml de la dilución correspondiente se sembró, por inclusión, en TSA para el recuento en placa. Por otra parte, se transfirió 1 ml de la muestra a un vial previamente hidratado con 3 ml de agua destilada estéril, para obtener el recuento por el sistema TEMPO. El vial se agitó en vórtex, para homogeneizar su contenido, y se transfirió, a través de la unidad de llenado TEMPO, a la tarjeta para su posterior incubación. Las muestras, tanto de cultivo convencional como en TEMPO, se incubaron a 30 °C durante 48 horas, posteriormente se recontaron y se calculó la cantidad de microorganismos en log (UCF cm<sup>-2</sup>).

En el caso de la cuantificación de las células que conforman los biofilms, mediante el sistema VIDAS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), se transfirieron 225 µl de la muestra no diluida al pocillo correspondiente de la tira reactiva mini VIDAS LMX (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y se introdujeron en el equipo. Los resultados se obtuvieron después de 80 minutos. VIDAS no es una técnica de cuantificación, sino una técnica de detección (Janzten *et al.* 2006). Por esta razón, en el presente estudio se realizó una curva patrón, con el objetivo de relacionar las Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) obtenidas en el equipo, con el recuento obtenido en UFC ml<sup>-1</sup>.

Finalmente, para la cuantificación de los biofilms mediante qPCR, se empleó el kit de detección de PCR IQ-Check *L. monocytogenes* II (Biorad, California, Estados Unidos). A partir de la muestra no diluida se transfirieron 1,5 ml a un tubo Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se centrifugaron mediante la centrífuga Heraeus Pico 17 (Thermo Scientific, Madrid, España) durante 5 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante obtenido se descartó y se añadieron 250 µl del reactivo de lisis, se agitó con vortex durante 3 minutos y se colocaron en el bloque de calor a 95 °C durante 20 minutos. Seguidamente, los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 12.000 rpm y se introdujeron 5 µl del sobrenadante de las muestras procesadas, en los diferentes pocillos de tiras para la reacción y lectura. Previamente, en los pocillos se habían introducido 45 µl de la mezcla de PCR, que contenía los amplificadores y las sondas fluorescentes. Las tiras se sellaron con tapas ópticas y se introdujeron en el sistema MiniOpticon (Biorad, California, Estados Unidos), obteniendo los resultados después de 70 minutos. Los valores de Ct obtenidos de cada muestra se analizaron usando el *software* CFX Manager (Biorad, California, Estados Unidos) y se hicieron los respectivos cálculos, mediante el empleo de una curva patrón, para acabar obteniendo los resultados en log (UFC cm<sup>-2</sup>).

#### ***1.6. Detección de biofilms producidos por las distintas cepas de L. monocytogenes***

Después del período de incubación, los discos se lavaron por duplicado con 3 ml de agua destilada estéril, para descartar aquellas células no adheridas. Una vez lavados, los discos se dejaron secar 5 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió una gota del biodetector BioFinder (iTram Higiene, Vic, España), con la intención de realizar la detección directa de biofilms producidos por bacterias catalasas positivas, en superficies de contacto con alimentos. La reacción se observó después de 10 segundos.

**1.7. Cuantificación de las células presentes en biofilms de *L. monocytogenes* formados en poliestireno mediante una curva de correlación entre OD<sub>595</sub> y UFC ml<sup>-1</sup>**

Se preparó el inóculo con las 17 cepas de *L. monocytogenes* en TSYEB<sub>gluc1%+NaCl2%</sub>, dando como resultado una suspensión aproximada de 10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. Una vez preparados los inóculos, se transfirieron 100 µl a dieciséis pocillos de una placa microtiter (Sudelab, Barcelona, España) por cepa. Cada experimento incluyó dieciséis pocillos de medio TSYEB<sub>gluc1%+NaCl2%</sub> sin *L. monocytogenes* como pocillos control. Las placas conteniendo los inóculos y los controles se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Tras las 48 horas de incubación, el medio de cada uno de los pocillos se descartó y los pocillos se lavaron dos veces con 100 µl de agua destilada estéril para descartar, de nuevo, aquellas células no adheridas. Posteriormente, las placas se secaron en campana de flujo laminar vertical durante 45 minutos. Cada pocillo se tiñó añadiendo 100 µl de solución de cristal violeta al 0,8 % en agua desionizada y se dejó reaccionar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, se eliminó la solución con el colorante. En este momento, los biofilms eran visibles como anillos morados en la base del pocillo.

Para proceder con el análisis cuantitativo del biofilm, el cristal violeta unido a las células se solubilizó, añadiendo 150 µl de etanol al 95 % para desteñir los pocillos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A partir de aquí, 100 µl de cada uno de los pocillos se transfirieron a una nueva placa microtiter y el nivel de cristal violeta presente en la solución decolorada se midió mediante un lector de placas microtiter (340 ATTC, SLT Labinstruments, Viena, Austria) a una densidad óptica de 595 nm (OD<sub>595</sub>).

Se realizó una curva patrón entre los valores OD<sub>595</sub> y el número de bacterias teñidas en los pocillos. La curva de correlación se obtuvo para la cepa de *L. monocytogenes* CECT 935, que es una cepa de referencia internacional por la ISO 11290 (AENOR, 1998) y para tres cepas más de *L. monocytogenes*, A7, EDG-e y CECT 5366, que se eligieron aleatoriamente. Primeramente, se preparó un inóculo con *L. monocytogenes* CECT 935 en TSYEB<sub>gluc1%+NaCl2%</sub>, con una concentración aproximada de 10<sup>9</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. De la suspensión, se transfirió 1 ml a un tubo Eppendorf. Las muestras se centrifugaron durante 30 segundos a 12.000 rpm con la centrífuga Heraeus Pico 17, (Thermo Scientific, Barcelona, España). Después de la centrifugación, *L. monocytogenes* era visible como un

pellet bacteriano. El sobrenadante fue eliminado y el pellet remanente se lavó dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente, cada tubo Eppendorf se tiñó añadiendo 1 ml de solución de cristal violeta al 0,8 % y se dejó reaccionar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se eliminó la solución con el colorante y se añadió 1 ml de etanol al 95 %, con el objetivo de desteñir a los pellets, y se incubó durante 30 minutos. A partir de este punto, se prepararon diluciones seriadas con etanol para observar una escala de mayor a menor absorbancia. Se transfirieron 100 µl de cada tubo Eppendorf a una placa de microtiter y se midió el nivel de cristal violeta en un lector de placas microtiter a una OD<sub>595</sub>. Los valores de densidad óptica se correlacionaron con las UFC ml<sup>-1</sup> obtenidas en el recuento en placa de la suspensión bacteriana inicial. Los resultados finales se expresaron como log (UFC cm<sup>-2</sup>).

### **1.8. Análisis estadístico**

Los recuentos bacterianos obtenidos se convirtieron en valores logarítmicos decimales para reducir la variabilidad de los ensayos microbiológicos. La normalidad se verificó utilizando la prueba Shapiro-Wilk. Los resultados fueron evaluados por ANOVA seguido del contraste *a posteriori* de Tukey mediante el paquete de software estadístico SPSS Statistics IBM 23. Además, se realizaron estudios de correlación entre variables de estimación mediante coeficiente de determinación y correlación de Pearson. Un  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

El análisis estadístico de la variancia fue utilizado para la comparación entre las diferentes técnicas analíticas, con el fin de conocer la relación o independencia, así como también para ver diferencias entre cepas en relación a la formación de biofilms. En el caso de los resultados obtenidos por el ensayo del cristal violeta, los datos se trabajaron en UFC cm<sup>-2</sup>. Para la determinación de la biomasa adherida, mediante este ensayo, también se realizó un ANOVA seguido de la prueba Tukey B.

## 2. Resultados y discusión

### 2.1. Comparación de diferentes métodos para la cuantificación de células que conforman biofilms maduros de *L. monocytogenes*

La cuantificación de las células presentes en biofilms maduros, producidos por diferentes cepas de *L. monocytogenes*, se investigó mediante diferentes métodos de recuento, con el fin de compararlos entre ellos y observar la mejor metodología a emplear para su cuantificación (**Tabla 11**).

La comparación entre los métodos de recuento se llevó a cabo por cepa y metodología, generando subconjuntos de valores con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ), permitiendo de esta forma agruparlos. Los resultados mostraron que, para las cepas de *L. monocytogenes* 911, R6, S1 (R), S1 (S), EDG-e, CDL69 y S2-1, los métodos de cuantificación podrían clasificarse en dos subconjuntos diferentes. El primero incluiría, para cada una de estas siete cepas, cuatro de los métodos empleados, incluyendo entre ellos DEM, recuento en placa, TEMPO y qPCR, ya que no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $P_{911} = 0,173$ ;  $P_{R6} = 0,432$ ;  $P_{S1(R)} = 0,358$ ;  $P_{S1(S)} = 0,285$ ;  $P_{EDG-e} = 0,189$ ;  $P_{CDL69} = 0,149$ ;  $P_{S2-1} = 0,144$ , respectivamente). En el segundo sólo se encontraría el método VIDAS. Esto indica que, para estas cepas, cualquiera de los métodos de cuantificación incluidos en el primer subconjunto, podría elegirse indistintamente como método de recuento microbiano, ya que no presentan diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre ellos. Branck *et al.* (2017), indicaron que emplear métodos indirectos de recuento, es decir, primero desprender las células que conforman el biofilm y justo después cuantificarlas, puede causar, en el caso de que el biofilm esté fuertemente formado, una desintegración incompleta de las agrupaciones, que da como resultado una subestimación del número de células que conforman estas estructuras.

Sin embargo, el hecho de que no hubiera diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), entre la observación directa de los biofilms formados por estas cepas, en los discos de acero inoxidable, mediante el uso de DEM, con el recuento en placa, TEMPO y qPCR, indica que, para estas siete cepas, la recuperación de células que conformaron los biofilms fue apropiada. Esto, a su vez, tiene sentido ya que son cepas que, por lo general, no han alcanzado los recuentos más elevados, lo que podría indicar que no son cepas tan

fuertemente productoras de biofilms. En los resultados obtenidos se puede observar que las cepas poseen diferentes capacidades de formación de biofilms y, por lo tanto, presentan recuentos bacterianos distintos, tal y como se ha señalado previamente (Borucki *et al.* 2003).

**Tabla 11.** Recuento de células que conforman biofilms maduros de *L. monocytogenes* (log (CFU cm<sup>-2</sup>)) mediante cinco métodos de cuantificación (DEM, recuento en placa, TEMPO, VIDAS y qPCR). Cada valor corresponde, en el caso de DEM a una media de dos repeticiones realizadas en tres días separados (n = 6), y en el resto de casos a una media de cuatro repeticiones realizadas en tres días separados (n = 12). Se ha calculado a su vez la desviación estándar.

Cepas <i>L. monocytogenes</i>	DEM	Recuento en placa	TEMPO	VIDAS	qPCR
<b>911</b>	5,87 ± 0,24 <sup>a</sup>	5,58 ± 0,12 <sup>a</sup>	5,62 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,29 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,99 ± 0,15 <sup>a</sup>
<b>A7</b>	5,99 ± 0,17 <sup>ab</sup>	5,75 ± 0,08 <sup>a</sup>	5,74 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,32 ± 0,01 <sup>c</sup>	6,32 ± 0,13 <sup>b</sup>
<b>R6</b>	6,31 ± 0,22 <sup>a</sup>	6,44 ± 0,11 <sup>a</sup>	6,26 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,49 ± 0,07 <sup>a</sup>
<b>P12</b>	6,32 ± 0,25 <sup>ab</sup>	6,05 ± 0,13 <sup>a</sup>	6,05 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,34 ± 0,01 <sup>c</sup>	6,53 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>S1(S)</b>	6,40 ± 0,11 <sup>a</sup>	6,15 ± 0,10 <sup>a</sup>	6,10 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,28 ± 0,14 <sup>a</sup>
<b>S1(R)</b>	6,41 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,09 ± 0,14 <sup>a</sup>	6,17 ± 0,14 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,39 ± 0,13 <sup>a</sup>
<b>EDG-e</b>	6,42 ± 0,18 <sup>a</sup>	6,15 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,17 ± 0,08 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,08 ± 0,16 <sup>a</sup>
<b>S10-1</b>	6,42 ± 0,34 <sup>ab</sup>	6,17 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,23 ± 0,08 <sup>ab</sup>	7,34 ± 0,01 <sup>d</sup>	6,64 ± 0,08 <sup>c</sup>
<b>S2-bac</b>	6,46 ± 0,26 <sup>ab</sup>	6,36 ± 0,05 <sup>ab</sup>	6,29 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,01 <sup>c</sup>	6,67 ± 0,07 <sup>b</sup>
<b>5366</b>	6,48 ± 0,14 <sup>b</sup>	6,06 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,10 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,30 ± 0,01 <sup>c</sup>	6,14 ± 0,03 <sup>a</sup>
<b>5873</b>	6,49 ± 0,19 <sup>b</sup>	5,65 ± 0,18 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,18 <sup>a</sup>	7,29 ± 0,01 <sup>c</sup>	5,87 ± 0,10 <sup>a</sup>
<b>CDL69</b>	6,52 ± 0,10 <sup>a</sup>	6,24 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,20 ± 0,09 <sup>a</sup>	7,31 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,46 ± 0,15 <sup>a</sup>
<b>S2-2</b>	6,54 ± 0,19 <sup>bc</sup>	6,23 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,28 ± 0,07 <sup>ab</sup>	7,32 ± 0,01 <sup>d</sup>	6,69 ± 0,08 <sup>c</sup>
<b>935</b>	6,66 ± 0,20 <sup>c</sup>	6,06 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,08 ± 0,10 <sup>ab</sup>	7,32 ± 0,01 <sup>d</sup>	6,45 ± 0,1 <sup>bc</sup>
<b>S2-1</b>	6,70 ± 0,13 <sup>a</sup>	6,43 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,43 ± 0,09 <sup>a</sup>	7,35 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,55 ± 0,09 <sup>a</sup>
<b>4423</b>	6,72 ± 0,12 <sup>ab</sup>	6,53 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,61 ± 0,07 <sup>ab</sup>	7,36 ± 0,02 <sup>c</sup>	6,88 ± 0,1 <sup>b</sup>
<b>5672</b>	6,94 ± 0,20 <sup>b</sup>	5,93 ± 0,14 <sup>a</sup>	6,09 ± 0,12 <sup>a</sup>	7,30 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,95 ± 0,12 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> Los valores dentro de una fila que carecen de un superíndice común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

Nilsson *et al.* (2011) estudiaron un total de 95 cepas de *L. monocytogenes* y evaluaron la producción de biofilms, en función de la temperatura de incubación, el medio de cultivo, el pH, el origen de la cepa, el serotipo y el estado de persistencia ambiental. Los autores observaron que había diferencias estadísticamente significativas entre la formación de

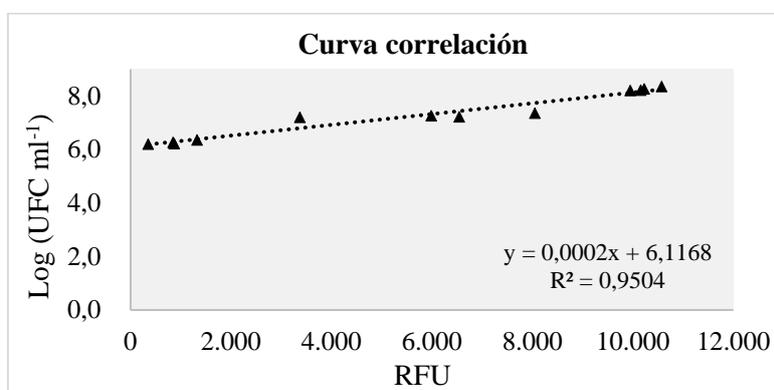
biofilms y las cepas. No obstante, no se indicó que las cepas con mayor capacidad de producir biofilms tuvieran una menor recuperación celular, debido a la protección que puede ejercer la matriz. En este caso, el método de cuantificación empleado juega un papel fundamental. Estos autores emplearon la tinción con cristal violeta y, por tanto, se da una tinción de toda la estructura, siendo innecesario el desprendimiento de las células que lo conforman. Es por esta razón que también se cuantificarán las bacterias vivas y muertas, siempre que haya una pared que teñir.

Para las cepas de *L. monocytogenes* A7, P12, S2-bac y 4423, se establecieron tres subgrupos, con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre los recuentos obtenidos; pero sin diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre los métodos de cuantificación, dentro de cada subgrupo. En este caso, las dos primeras cepas se incluyeron en el primer grupo, que incorporaron el recuento en placa, TEMPO y DEM. El segundo incluyó DEM y qPCR, y finalmente, el tercero, solo incluyó VIDAS. Las dos últimas cepas, S2-bac y 4423, presentaron la misma clasificación que las dos anteriores, pero con la diferencia que, *L. monocytogenes* S2-bac también incluyó el recuento en placa, dentro del segundo subconjunto, al no presentar diferencias estadísticamente significativas con DEM y qPCR ( $P = 0,966$ ;  $P = 0,059$ , respectivamente). *L. monocytogenes* 4423, en cambio, incluyó el recuento en TEMPO dentro del segundo subconjunto, debido a que no presentó diferencias estadísticamente significativas, ni con DEM, ni con qPCR ( $P = 0,917$ ,  $P = 0,088$ , respectivamente).

El hecho de que los métodos de cuantificación de un subconjunto, no muestren diferencias significativas entre ellos, implica que esas metodologías de recuento podrían usarse indistintamente. Sin embargo, algo diferente ocurrió con *L. monocytogenes* 5672, que fue la cepa que presentó el mayor recuento obtenido por DEM de células viables. Ésta fue la única cepa que no tuvo diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,278$ ) entre DEM y VIDAS, como métodos de cuantificación. Por tanto, la recuperación de células adheridas fue baja, lo que podría deberse al hecho de que la cepa tiene una alta tasa de producción de sustancias, que forman la matriz del biofilm, haciéndola más resistente a la abrasión de las perlas, con lo que el recuento obtenido será menor, tal y como Wilson *et al.* (2004) sugirieron para la recuperación de células de *P. aeruginosa*. En estos casos, el método de separación de las células en un biofilm, mediante el empleo de perlas de vidrio, tendría una infravaloración del recuento real. Por ello, sería interesante desarrollar

una formulación, que permita la rotura de la matriz del biofilm. Ésta podría ser una alternativa eficaz y específica, para el recuento de células en biofilms generados, tanto en el laboratorio, como salvajes.

VIDAS es un ensayo fluorescente ligado a enzimas (ELFA) automatizado, altamente empleado para la detección rápida de diferentes patógenos, entre ellos *L. monocytogenes*. La industria alimentaria necesita técnicas rápidas para el análisis microbiológico de los alimentos y superficies de contacto con alimentos, con el fin de garantizar los estándares de seguridad alimentaria exigidos a día de hoy (Saad *et al.* 2013; Nemati *et al.* 2016). VIDAS satisface esta necesidad además de ser fácil de manejar y permitir el análisis simultáneo de varias muestras (Kumar *et al.* 2008). Sin embargo, este sistema no sería una técnica de cuantificación sino una técnica de detección (Janzten *et al.* 2006). Por esta razón, en el presente estudio se realizó una curva patrón entre RFU, obtenidas después de la evaluación de una muestra por este método, y UFC ml<sup>-1</sup>. La curva estándar demostró ser capaz de cuantificar entre 6 y 8 log (CFU ml<sup>-1</sup>). Ambos extremos implican una carga microbiana muy elevada (**Figura 30**).

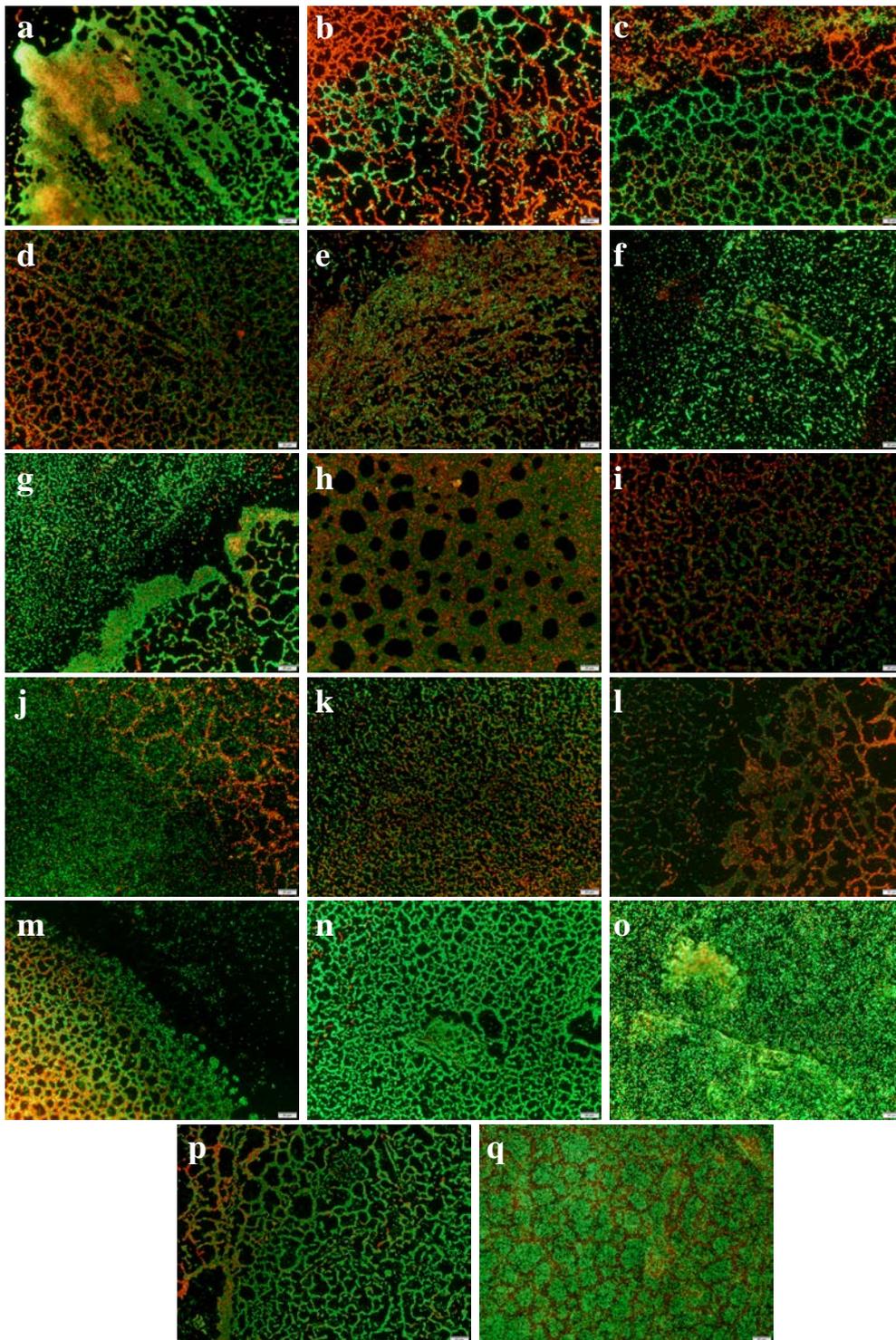


**Figura 30.** Correlación entre el recuento de *L. monocytogenes* (log (UFC ml<sup>-1</sup>)) y RFU obtenidas mediante el análisis por VIDAS.

La única cepa de *L. monocytogenes* que no mostró diferencias estadísticamente significativas entre VIDAS y DEM fue *L. monocytogenes* 5672, que fue considerada como la cepa con mayor capacidad de formación de biofilms. Esto es lógico, si se tiene en cuenta que la generación de alta concentración de bacterias en un biofilm, superarán

con creces los 6 log (UFC cm<sup>-2</sup>). Por tanto, estará siempre entre los límites de la linealidad de la curva de cuantificación por VIDAS (**Figura 30**). El otro subconjunto de métodos encontrado para esta cepa incluyó el recuento en placa, TEMPO y qPCR, no mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,900$ ) entre ellos. Esto se puede atribuir al hecho de que, como *L. monocytogenes* 5672 fue la cepa con mayor producción de biofilms, pudo haber secretado más matriz y como consecuencia, que la recuperación celular, para la posterior cuantificación mediante los métodos indirectos, pudo haber sido insuficiente. Sin embargo, VIDAS, que también es un método indirecto, no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,278$ ) con el método de cuantificación directa (DEM), aunque sí con todos los demás ( $P < 0,05$ ), lo que indica que VIDAS sobreestimó el resultado. Esta podría ser la razón por la cual coinciden los resultados de ambos métodos, DEM y VIDAS, aunque el último no representaría un resultado real. La búsqueda de metodologías para la recuperación adecuada de las células microbianas que conforman los biofilms, especialmente aquellas que tienen una matriz protectora muy abundante, como mediante la aplicación de ciertas enzimas para disgregar el biofilm y recuperar las células para posteriormente cuantificarlas, podría ser una línea interesante de continuación de este estudio.

DEM es un método de recuento directo, ya que permite observar y cuantificar posteriormente, mediante el uso de un *software* de análisis de imagen, las células adheridas a una superficie (Surman *et al.* 1996; Hannig *et al.* 2010). Sin embargo, los métodos como el recuento en placa, TEMPO, VIDAS y qPCR se considerarían métodos indirectos, ya que requieren un desprendimiento previo de las células que conforman el biofilm en la superficie, antes de cuantificarlas (Costerton *et al.* 1995). Para los métodos indirectos, es completamente crucial la extracción adecuada de los microorganismos adheridos a las diferentes superficies, antes del análisis microbiológico (Ismail *et al.* 2013). En el presente estudio, el método de recuperación empleado para la cuantificación indirecta de las células, que conformaron los biofilms, fue el uso de perlas de vidrio y agitación vigorosa, ya que se ha demostrado previamente ser eficaz para desprender las células adheridas en el acero inoxidable (Fontecha-Umaña 2014; Ríos-Castillo *et al.* 2017). Las imágenes obtenidas por DEM permiten observar la disposición de las células que conforman la estructura en las superficies (**Figura 31**).



**Figura 31.** Imágenes obtenidas, mediante DEM, de biofilms maduros de distintas cepas de *L. monocytogenes*, teñidos con Life/Dead, clasificadas de menor a mayor capacidad de producción de biofilms; (a) 911; (b) A7; (c) S1(S); (d) 5366; (e) R6; (f) S1(R); (g) P12; (h) 5873; (i) EDG-e; (j) CDL69; (k) S10-1; (l) S2-1; (m) S2-2; (n) 935; (o) S2-bac; (p) 4423; (q) 5672. Aumento 20X.

La cuantificación de las células que conforman los biofilms por microscopía es valiosa, no solo porque permite trabajar con la superficie de una forma directa, sino que también contribuye a dar una idea global sobre la morfología del biofilm (Lourenço *et al.* 2012). En los resultados obtenidos, todas las cepas de *L. monocytogenes* empleadas en el estudio mostraron la capacidad de producir biofilms maduros, altamente organizados, con estructuras tipo panal de abejas como morfotipo del biofilm, tal y como ha sido observado previamente por otros autores (Marsh *et al.* 2003; Guilbaud *et al.* 2015). En concordancia con Reis-Teixeira *et al.* (2017), en algunas cepas de *L. monocytogenes* se obtuvo una superposición de los colorantes SYTO9 y PI, produciendo una coloración amarilla (**Figura 31 - a, b, c, e, g, h, m, o, q**), lo que podría sugerir una lisis celular y liberación de ADN extracelular (ADN-e). Se ha demostrado que el ADN-e es un componente estructural relevante en la matriz extracelular de *L. monocytogenes*, donde coopera junto con los polisacáridos y las proteínas, garantizando la integridad del biofilm (Colagiorgi *et al.* 2016).

Cabe destacar que las cepas con mayor diferencia en los recuentos entre DEM y los otros tres métodos de cuantificación fueron A7, P12, S1 (R), 5366, 5873, 935 y 5672. De todas estas cepas, las tres primeras tienen valores de qPCR más altos que los valores de DEM. Contrariamente, en las últimas cuatro, los resultados de los tres métodos de recuento indirecto, es decir, recuento de placa, TEMPO y qPCR, fueron menores que los obtenidos por DEM. Este hecho puede indicar que las cepas fuertemente productoras de biofilms pueden hacer, que la matriz que engloba el conjunto de la estructura, fuera tan abundante que impidió un buen desprendimiento de las células adheridas a la superficie y, como consecuencia, los recuentos pudieron haber sido subestimados. Las cepas de *L. monocytogenes* A7, P12 y S1 (R) presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en el recuento obtenido por DEM y los otros tres métodos de cuantificación. En este caso, es notable comentar que, los resultados obtenidos por el recuento en qPCR, son ligeramente superiores que el recuento por DEM. Los resultados obtenidos por DEM se expresaron como células viables, aunque también es posible observar células no viables mediante esta técnica.

La qPCR, sin embargo, tan solo es capaz de detectar cadenas de ADN, sin poder discriminar las células viables de aquellas que no lo son. Por esta razón, es posible que la cuantificación por qPCR resulte ser más alta que la cuantificación por DEM, ya que en

los biofilms formados por estas cepas se encontró un porcentaje ligeramente mayor de células no viables en comparación con el resto de las cepas, como otros autores han señalado (Besnard *et al.* 2000; Guilbaud *et al.* 2005; Nocker *et al.* 2006; Winkelströter y de Martinis 2015). No obstante, la cuantificación de las células de *L. monocytogenes* presentes en biofilms por qPCR ha demostrado proporcionar medidas precisas (Klančnik *et al.* 2015). La curva de correlación obtenida para qPCR entre los valores de Ct y UFC ml<sup>-1</sup> mostró una correlación lineal ( $R^2 = 0,9917$ ), siendo el límite de detección 10<sup>2</sup> UFC ml<sup>-1</sup> como ya ha sido indicado por otros autores (Salas-Vázquez 2007).

Cada metodología de recuento tiene sus propios límites de cuantificación (**Tabla 12**). El rango de recuento depende del método seleccionado y, a su vez, del tipo de técnica que se utilice. En este caso, si es una técnica directa (DEM), tan solo se podrán cuantificar, de una forma directa, muestras cuyo rango se encuentre entre 10<sup>3</sup>-10<sup>9</sup>. Por el contrario, si es una técnica indirecta, la metodología tendrá su propio límite de cuantificación, pero siempre se podrá cuantificar un mayor número de células aumentando la dilución. Los límites en el recuento también influyen de una forma importante en la elección del método de cuantificación (Jasson *et al.* 2010).

**Tabla 12.** Límites de cuantificación aproximados para las diferentes técnicas de recuento empleadas.

Técnica	Límite inferior	Límite superior
DEM <sup>o</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>9</sup>
Recuento en placa <sup>y</sup>	30	300
TEMPO <sup>λ</sup>	1	4900
VIDAS <sup>λ</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>
qPCR <sup>λ</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>8</sup>

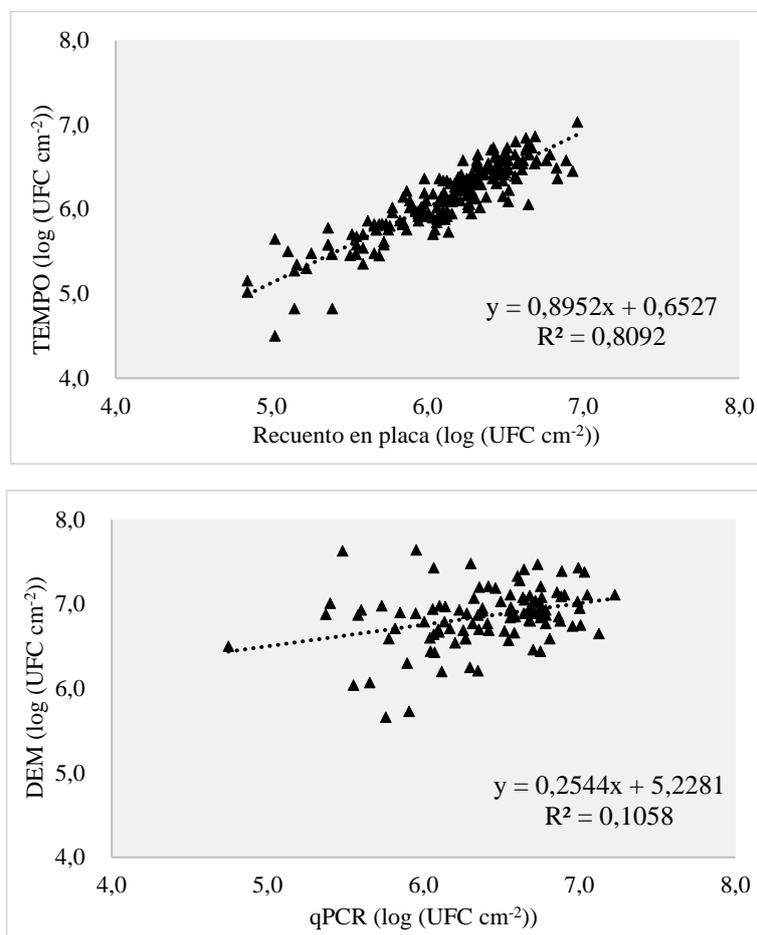
<sup>o</sup>UFC cm<sup>-2</sup>

<sup>y</sup>UFC por placa

<sup>λ</sup>UFC ml<sup>-1</sup>

La comparación entre los cinco métodos de cuantificación también se llevó a cabo a nivel de especie, es decir, por el conjunto global de todas las cepas. El estudio estadístico determinó que hubo tres subconjuntos notables. El primero, que incluía el recuento en placa y TEMPO ( $P = 0,998$ ), el segundo incluía DEM y qPCR ( $P = 0,508$ ), y finalmente, el tercero incluía sólo VIDAS, el cuál mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con el

resto de métodos. Por esta razón, también se realizaron estudios de correlación entre el recuento en placa y TEMPO, y entre el recuento obtenido por DEM y por qPCR (**Figura 32**). Los resultados obtenidos muestran una alta correlación entre el recuento en placa y TEMPO ( $R^2 = 0,8092$ ) pero, sin embargo, no muestran una correlación directa entre DEM y qPCR ( $R^2 = 0,1058$ ). Aunque a nivel de especie no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), en el estudio de correlación se demostró que en todo el conjunto, tanto DEM como qPCR no se podrían emplear indistintamente para cuantificar las células que conforman biofilms de *L. monocytogenes*, sino que dependería de la especie en concreto y de su recuperación.



**Figura 32.** Correlación entre, por una parte TEMPO y recuento en placa ( $n = 204$ ), y por la otra, DEM y qPCR ( $n = 102$ ) de los recuentos (log (UFC cm<sup>-2</sup>)) obtenidos a partir de la cuantificación de biofilms de *L. monocytogenes*.

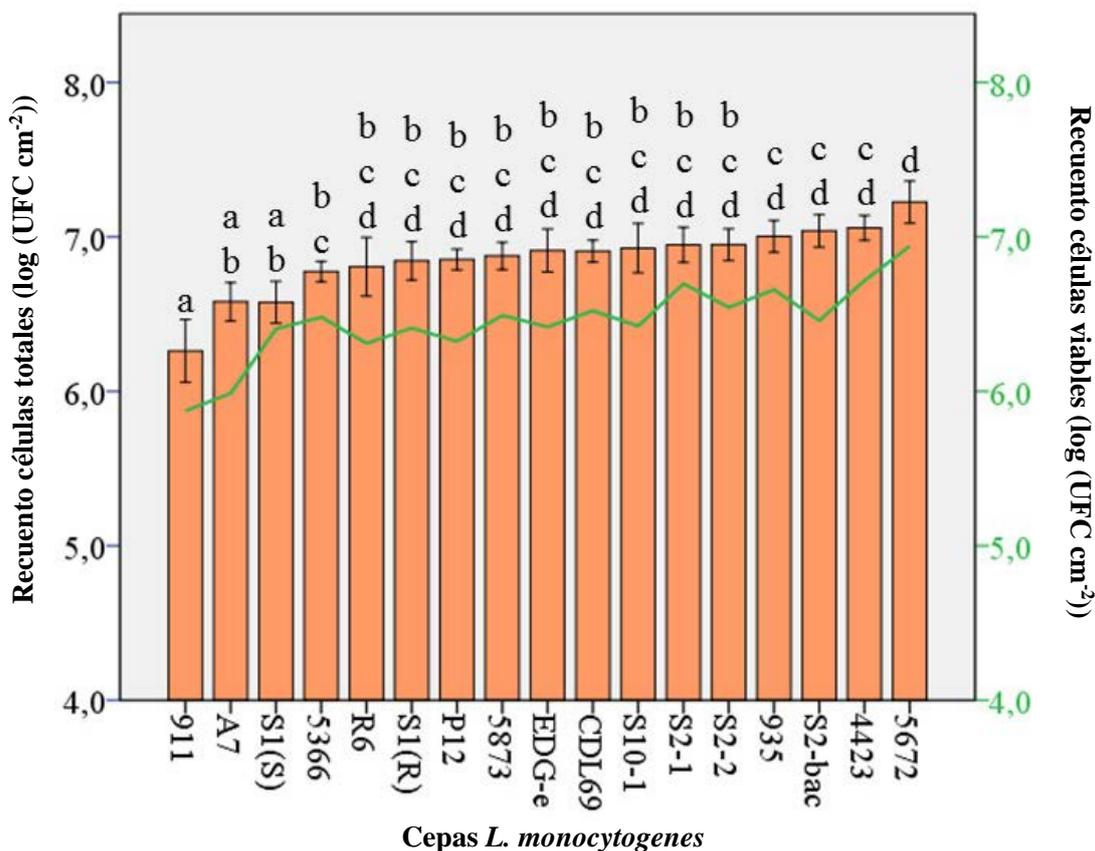
En este estudio, además, se encontró que mediante el recuento en placa y TEMPO los recuentos obtenidos podrían diferenciarse de los obtenidos con DEM y qPCR, y ésto se podía atribuir a las células no viables, lo que concuerda con resultados señalados en otros estudios, en los que, mediante el recuento en placa, se llegaron a obtener resultados entre 1 a 3 log (UFC) inferiores a aquellos obtenidos mediante DEM y qPCR (Boutaga *et al.* 2005; Ammann *et al.* 2013). En los resultados obtenidos, además, el hecho de que el recuento en placa y TEMPO tengan una correlación tan alta, también está en concordancia con otros estudios realizados (Owen *et al.* 2010; Blagoeva *et al.* 2014). No obstante, Fritz *et al.* (2015) indicaron que, aunque el recuento en placa convencional es el método más comúnmente utilizado para cuantificar las células bacterianas viables, otros métodos que requieren menos tiempo, tanto de preparación de muestra como de procesado, pueden llegar a reemplazarlo. En este sentido, TEMPO sería un buen sistema a emplear, porque daría resultados equivalentes al recuento convencional, que es el que se emplea en las normas estándares de cuantificación microbiana.

El hecho de tener sistemas de muestreo de superficies adaptados a la industria alimentaria, como son los sensores SCH, en los que se han generado modelos de producción de biofilms y se han comparado diferentes sistemas de recuento; ayuda a poder seleccionar cuál de ellos es más apropiado para emplear, tanto a nivel *in vitro*, como a nivel industrial. En este sentido, la metodología más realista podría ser DEM, porque se podría observar de una forma directa las células presentes, tanto viables como no viables y posteriormente cuantificarlas. No obstante, requiere de un elevado esfuerzo visual por parte del técnico, y, como consecuencia, no se podría procesar un elevado número de muestras. Es por esta razón, que la elección de un método de recuento indirecto, aunque se llegara a subestimar en parte los resultados, podría ser una buena opción. En este sentido, VIDAS y qPCR serían técnicas indirectas, que se han adaptado para la cuantificación mediante la generación de curvas patrón. Aunque mediante qPCR se han obtenido unos buenos resultados, no es una técnica económica, sino más bien lo contrario. El uso de qPCR podría ser de mucha utilidad, cuando se requiere diferenciar el patógeno en concreto, en este caso *L. monocytogenes*, de otras especies en un biofilm mixto. Pero, cuando tan solo se quiere cuantificar el biofilm de una especie, métodos indirectos como el recuento en placa o TEMPO, serían suficientemente adecuados. Entre estas dos metodologías, que han demostrado tener una elevada correlación ( $R^2 = 0,8092$ ), se podría seleccionar TEMPO, al ser un método rápido, que implica menos tiempo de manipulación de la

muestra y una menor necesidad de dedicación del técnico para un trabajo rutinario. Además, permite la estandarización del proceso y trabajar según normas de calidad.

## 2.2. Comparación de recuentos de células viables y totales de biofilm entre cepas de *L. monocytogenes*

Los recuentos microbianos obtenidos mediante DEM y ordenados de forma ascendente, desde la cepa de *L. monocytogenes* menos productora de biofilms (911), hasta la cepa con mayor capacidad de producción de biofilms (5672), se muestran en la **Figura 33**.



**Figura 33.** Recuentos (log (UFC cm<sup>-2</sup>)) de células totales, representadas en barra, y células viables, representadas en línea, tras el análisis de imágenes obtenidas mediante DEM de biofilms producidos por diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Las barras de error representan el error estándar de la media. <sup>a-d</sup> Las barras que carecen de un superíndice común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

La cantidad total de células, es decir, la suma de células viables y no viables, varió de 6,26 log (CFU cm<sup>-2</sup>) a 7,23 log (CFU cm<sup>-2</sup>). El número de células viables, sin embargo, varió de 5,87 log (CFU cm<sup>-2</sup>) a 6,94 log (CFU cm<sup>-2</sup>). Después del análisis estadístico, se encontraron cuatro grupos significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) (A - D). En estos grupos hubo cepas que pertenecían a un solo grupo, como *L. monocytogenes* 911 y 5672, mientras que otras cepas se clasificaron en más de un grupo, como *L. monocytogenes* A7 (grupos A y B). Dentro del mismo subconjunto, no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,091$ ,  $P = 0,082$ ,  $P = 0,192$  y  $P = 0,061$ , para los grupos A, B, C y D, respectivamente) entre las cepas de *L. monocytogenes* incluidas en él. Debe señalarse también que, en general, la proporción de células no viables se mantuvo bastante uniforme entre las cepas de *L. monocytogenes*, aunque en algunas de ellas como A7, R6, P12, EDG-e, S10-1, S2-2 y S-2bac, la proporción de células no viables fue mayor.

Tal y cómo se ha sugerido, la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biofilms le permite persistir en entornos de procesamiento de alimentos y, por lo tanto, ser transferidos a productos alimenticios (Borucki *et al.* 2003; Martínez-Suárez *et al.* 2016). Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron, que las diferentes cepas de *L. monocytogenes*, poseen distintas capacidades de formación de biofilms, lo que también ha sido observado por Djordjevic *et al.* (2002), Stepanovi *et al.* (2007) y Doijad *et al.* (2015), que trabajaron con cloruro de polivinilo (PVC) como material de contacto alimentario. También por Bonsaglia *et al.* (2014), que investigaron la formación de biofilms de treinta cepas de *L. monocytogenes* aisladas de entornos de procesamiento de leche en acero inoxidable y vidrio.

Una de las características más importantes para la diferenciación entre cepas microbianas es el serotipado, especialmente útil en epidemiología (Nho *et al.* 2015). Por esta razón, varios investigadores han asociado serotipos con diversos atributos de *L. monocytogenes*, siendo la capacidad de formación de biofilms uno de ellos (Orsi *et al.* 2011; Wang *et al.* 2017; Zoz *et al.* 2017). Con respecto a este patógeno, la relación establecida entre el serotipo y formación de biofilms sigue sin resolverse (Kadam *et al.* 2013). Algunos investigadores han encontrado correlación entre el serotipo de *L. monocytogenes* y su capacidad para formar biofilms (Lourenço *et al.* 2012), aunque otros no han encontrado ninguna correlación (Djordjevic *et al.* 2002; Stepanovi *et al.* 2007; Doijad *et al.* 2015).

En la **Tabla 13** se muestra la relación entre los serotipos y la capacidad de formación de biofilms de este patógeno. El serotipo 4b presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,003$ ) con el serotipo 1/2c. De hecho, dos de las cepas de *L. monocytogenes*, que fueron consideradas como fuertes productoras de biofilms, se incluyeron dentro del grupo 4b (5672 y 935), de un total de 3 cepas clasificadas en este serotipo. En cuanto al resto de los serotipos, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,032$ ) entre el 1/2a, que incluye la mayoría de las cepas empleadas en el estudio (12), y el 1/2c, que solo incluyó la cepa 911, con la que se obtuvo una menor producción de biofilms. Los resultados obtenidos no permiten concluir si existe una relación entre el serotipo y la capacidad para la formación de biofilm. Esto puede ser debido a que la distribución de serotipos analizados no fue homogénea, ya que 12 de ellas proceden de industria alimentaria, en la que se apreció una dominancia del serotipo 1/2a. Nilsson *et al.* (2011) observaron que, de un total de 95 cepas de *L. monocytogenes*, con orígenes y serotipos distintos, las cepas 1/2a produjeron significativamente más biofilms que las cepas pertenecientes a otros serotipos, indicando que existe una correlación entre la formación de biofilms y el serotipo, siendo 1/2a el serotipo más persistente en la industria alimentaria.

**Tabla 13.** Comparación de la producción de biofilms de *L. monocytogenes* entre los cuatro serotipos empleados en el estudio.

Comparación entre serotipos			Diferencia en la media	P valor
1/2a	vs	1/2c	0,566	0,032
1/2a	vs	2a	0,182	1,000
2a	vs	1/2c	0,548	0,201
4b	vs	1/2a	0,253	0,193
4b	vs	1/2c	0,819	0,003
4b	vs	2a	0,271	0,627

Establecer una relación entre la producción de biofilms y el serotipo al cual pertenece una cepa, es relevante a nivel industrial, pues puede dar información sobre la persistencia. En el presente estudio se observó que todas las cepas aisladas de la empresa colaboradora, a excepción de la cepa S10-1, correspondían al serotipo 1/2a. Tal y como se ha discutido anteriormente, este serotipo es el que se aísla con más frecuencia en muestras de alimentos

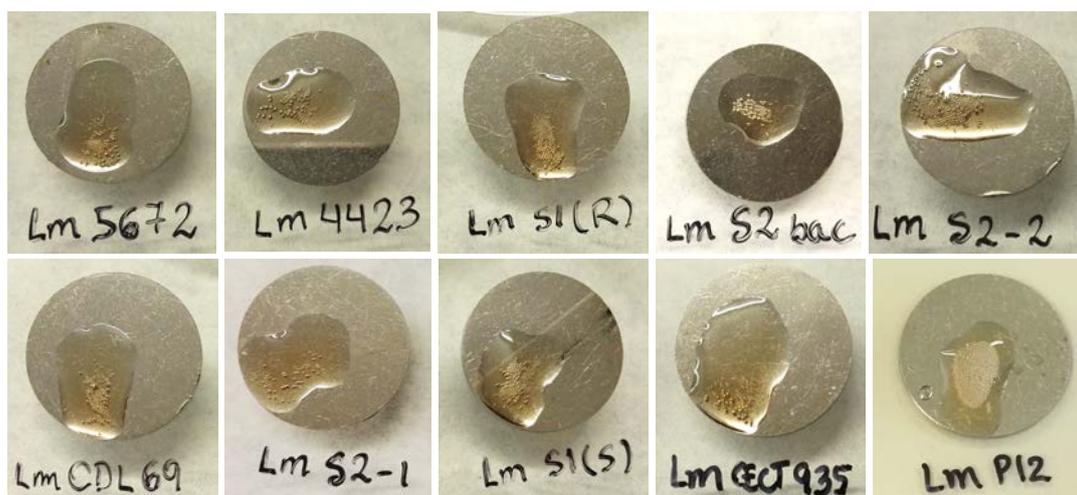
y ambientales (Ortiz *et al.* 2010). En este sentido, se podría decir, que este serotipo tiene mayor persistencia en entornos industriales, con respecto al resto de serotipos, dado que son fuertes formadores de biofilms. Por ello, se hace necesario aplicar sistemas de higienización efectivos, a fin de eliminar la persistencia de estas cepas, lo que seguramente redundaría en una mejora en la seguridad del proceso y del alimento producido. En consecuencia, se diseñó un estudio con el objetivo de desarrollar y evaluar un producto enzimático destinado a este fin.

### **2.3. Detección visual de biofilms mediante un biodetector de actividad microbiana**

La detección rápida de biofilms en la industria alimentaria es completamente esencial para evitar posibles problemas de contaminación cruzada. Por esta razón, en el presente estudio también se evaluaron, mediante el uso del producto BioFinder, los biofilms producidos por las 17 cepas de *L. monocytogenes* en discos de acero inoxidable.

El producto mostró una reacción positiva marcada, con una ligera formación de burbujas en todas las cepas estudiadas (**Figura 34**). Estos resultados coinciden con los descritos en la sección 2.1. referente a la cuantificación de biofilms, lo que indica que BioFinder se puede utilizar como una herramienta para la detección de biofilm del patógeno. Además, los resultados obtenidos complementan aquellos señalados previamente, donde este producto fue probado para la detección de biofilms formados por distintos microorganismos, siendo *L. monocytogenes* uno de ellos, sobre superficies de acero inoxidable y poliestireno (Ripolles-Avila *et al.* 2018). En este estudio se indicó que *L. monocytogenes* mostró una reacción ligeramente positiva. No obstante, los biofilms se formaron durante un período máximo de incubación de 72 horas y, por lo tanto, no se consiguieron estructuras tan maduras como en el presente estudio. Ésta puede ser la razón por la cual, en los resultados obtenidos en este estudio, la reacción fue más marcada. Aunque también existen kits para medir la cantidad de ATP en las superficies y relacionarlo con la presencia microbiana en las superficies, algunos autores indican que no sería una adecuada herramienta para muestrear biofilms, particularmente cuando éstos están maduros, ya que lejos de permitir la evaluación de biofilms en las superficies, están orientados a la detección de restos celulares o microorganismos viables

independientemente de su estado de asociación (Lorenzo-Cartón *et al.* 2011). Esto puede ser debido a la realización de un muestreo por estimación. En el presente estudio se ha demostrado la eficacia de los SCH en el muestreo directo de las superficies. Por tanto, sería necesario un nuevo estudio, que ponga de manifiesto, si la medida de la bioluminiscencia puede ser un buen sistema de recuento indirecto de biofilms en superficie.

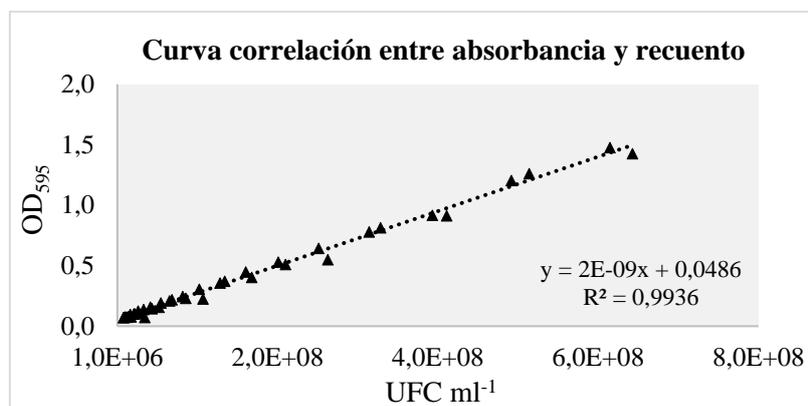


**Figura 34.** Reacciones después de la aplicación de BioFinder para la detección de biofilms de diferentes cepas de *L. monocytogenes*. La detección se relaciona con la presencia de burbujeo en la superficie.

Existe una demanda creciente de la industria alimentaria por disponer de respuestas rápidas para la detección de biofilms, con el fin de tomar medidas asociadas y prevenir problemas (Tan *et al.* 2014). Välimaa *et al.* (2015) concluyeron que es indispensable pasar de las técnicas convencionales a otras alternativas. Aunque los laboratorios de la industria y la administración, especialmente aquellos acreditados por la norma ISO 17025, suelen tardar en llevarlos a cabo, se están adoptando progresivamente métodos rápidos de aplicación industrial, al principio junto con los métodos estándares, aunque tras su verificación, se reemplazan por su facilidad de uso e interpretación.

#### 2.4. Cuantificación de *L. monocytogenes* en poliestireno mediante el ensayo de cristal violeta y la curva de correlación desarrollada

El ensayo de cristal violeta empleado para la evaluación de biofilms de *L. monocytogenes* fue inicialmente propuesto por Christensen *et al.* (1985) y adaptado por otros autores (Djordjevic *et al.* 2002; Borucki *et al.* 2003; Stepanovi *et al.* 2007). Sin embargo, se consideró necesaria una reinterpretación del método para reflejar, con mayor precisión, la biomasa adherida en la superficie. Para lograr esto, se realizó una correlación entre los valores OD<sub>595</sub> y UFC ml<sup>-1</sup>, para establecer una curva patrón como base para comparar los valores OD<sub>595</sub> que se obtuvieran en las placas microtiter (**Figura 35**).

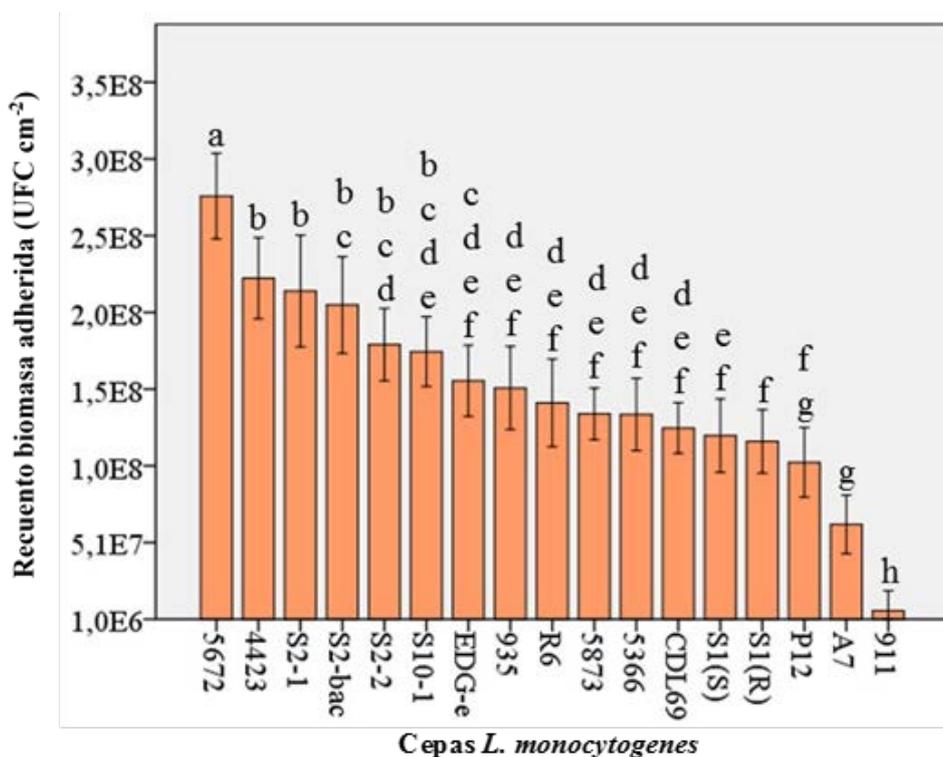


**Figura 35.** Correlación entre el recuento de *L. monocytogenes* (UFC ml<sup>-1</sup>) y la medida de absorbancia a OD<sub>595</sub> obtenida mediante el análisis por cristal violeta.

Los resultados indican que hay una alta correlación entre la absorbancia y el recuento. Por tanto, el nuevo método es altamente confiable para cuantificar la densidad celular de *L. monocytogenes*, especialmente cuando ésta se encuentra a concentraciones elevadas. La relación lineal se puso de manifiesto en el rango comprendido entre  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^9$  células ml<sup>-1</sup>, con una correlación significativa (coeficiente de determinación,  $R^2 = 0,9936$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre las curvas de correlación realizadas con las cuatro cepas de *L. monocytogenes* y, por lo tanto, se demostró que la misma curva de regresión podía emplearse para estimar el número de células que conformaban los biofilms, de las diecisiete cepas diferentes de *L.*

*monocytogenes*. El hecho de obtener los resultados, como recuentos microbianos, es una herramienta mejor y más útil que la simple medida de densidad óptica, ya que permite comparar simultáneamente diferentes métodos de cuantificación.

La cuantificación de la densidad celular de *L. monocytogenes* se investigó estáticamente, después de un período de incubación de 48 horas. Bajo estas condiciones, los valores de OD<sub>595</sub> de cristal violeta obtenidos variaron entre las diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Mediante el uso de la curva patrón mostrada anteriormente y corrigiendo el valor para obtener cm<sup>2</sup>, se obtuvieron valores de UFC cm<sup>-2</sup> que variaron de 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> (Figura 36).



**Figura 36.** Recuentos microbianos (UFC cm<sup>-2</sup>) obtenidos a partir de la cuantificación de la biomasa adherida de diferentes cepas de *L. monocytogenes* mediante el ensayo de cristal violeta. Cada valor corresponde a la media de tres repeticiones con dieciséis réplicas por ensayo (n = 48). Las barras de error representan el error estándar de la media. <sup>a-h</sup> Las barras que carecen de un superíndice común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

Después de aplicar la prueba estadística de Tukey, se encontraron 8 grupos (codificados de a - h) con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre ellos. Entre estos

grupos, se encontraron cepas que pertenecían a un solo grupo, como *L. monocytogenes* 5672, 4423, S2-1, S1 (R), A7 y 911, y otras que se pudieron clasificar en más de un grupo. La cepa *L. monocytogenes* 5672 se ajustó solo al grupo A, mientras que la cepa *L. monocytogenes* S2-bac se ajustó a los grupos B y C. Se observó que todas las cepas de *L. monocytogenes* fueron capaces de adherirse y empezar la formación de biofilms, aunque se determinó que algunas de las cepas fueron mejores productoras que otras, por la diferencia en los recuentos microbianos. La diferencia entre la cepa con mayor recuento y la cepa con menor recuento fue de 2 log (UFC cm<sup>-2</sup>). *L. monocytogenes* CECT 5672, categorizada en el grupo A, fue la mayor productora y fue significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) del resto de las cepas. *L. monocytogenes* CECT 911, categorizada en el grupo H, fue la menor productora de biofilms con el nivel mínimo de recuento celular detectado, observándose diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con el resto de las cepas. *L. monocytogenes* 4423, S2-1, S2bac, S2-2 y S10-1 se categorizaron en el grupo B, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,298$ ) entre ellos. Con el resto de las cepas, sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ), a excepción de *L. monocytogenes* S2-bac, S2-2 y S10-1, que se clasificaron en más de un grupo. En el caso de *L. monocytogenes* S2-bac, no sólo no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre las cepas que pertenecieron al grupo B, sino que tampoco se observaron diferencias significativas ( $P = 0,06$ ) con *L. monocytogenes* S2-2, S10-1 y EDG-e (grupo C). Se consideró que las cepas más similares con respecto a su capacidad para producir biofilms fueron las siguientes: *L. monocytogenes* EDG-e, R6, CDL69 y CECT 935, 5873, 5366 que se categorizaron simultáneamente en tres grupos D, E y F. Estas cepas presentaron diferencias menos significativas en comparación con el resto de las cepas, por lo que podrían compartir similitudes.

Como se ha comentado anteriormente, las diecisiete cepas empleadas en este estudio pertenecían a diferentes serotipos, que a su vez se pueden agrupar en divisiones. La División I consiste en el serotipo 4b, la División II consiste en los serotipos 1/2a y 1/2c y las cepas pertenecientes a los serotipos 2a se consideran como otros serotipos. También se observaron variaciones en los recuentos obtenidos a nivel de divisiones, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Por el contrario, otros estudios han encontrado diferencias a nivel estadístico cuando se correlaciona la formación de biofilms con la división filogenética (Djordjevic *et al.* 2002; Borucki *et al.*

2003). Para poder obtener un resultado más representativo, sería importante aumentar el número de cepas pertenecientes a los serotipos 4b, 1/2a y 2a, puesto que, como se ha discutido anteriormente, los grupos bajo estudio no fueron homogéneos.

Este tipo de técnicas, mediante las cuales se obtienen resultados de una forma rápida, funcionan muy bien cuando se pretende hacer un *screening*. Su problema es que no mimetizan la realidad, en especial cuando se emplean periodos de incubación de 48 horas. Como ya se ha descrito anteriormente, no sería suficiente para obtener biofilms en su estado maduro. Por ello, serían necesarios más estudios para determinar si el empleo de esta técnica en biofilms maduros es realista, así como también hacer comparaciones con otras metodologías de cuantificación, para poder precisar si se trata de una buena herramienta.

**VII. Eliminación de biofilms formados sobre acero inoxidable por cepas salvajes de *Listeria monocytogenes*, aisladas de la planta de procesamiento de cerdo ibérico**



## 1. Materiales y métodos

### 1.1. Superficies de estudio

Se emplearon, como en el capítulo anterior, discos de acero inoxidable AISI 316 con grado 2B, de 2 cm de diámetro y 1 mm de grosor. Justo antes de ser empleados, los discos fueron sometidos a procedimientos de limpieza y desinfección tal y como indica la norma europea UNE-EN 13697:2015 (descrito en Capítulo V sección 1.1). Con el objetivo de garantizar que los discos de acero inoxidable estuvieran completamente estériles, se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C previamente a la inoculación bacteriana.

### 1.2. Cepas bacterianas

Es este estudio se utilizaron un total de tres cepas de *L. monocytogenes* que fueron aisladas de la planta de procesado, colaboradora en el estudio (ver Capítulo IV sección 2.3.). El criterio de elección se basó en la selección de una cepa encontrada en cada uno de los puntos, donde hubo presencia del patógeno. Además, coincidió que pertenecían a serotipos distintos. En este caso, como fueron tres los puntos en los que se aisló *L. monocytogenes*, se seleccionaron tan solo tres cepas. De esta manera, se escogieron aquellas codificadas como Lm1 (serotipo 4b), que se aisló en el punto 5, correspondiente al armario de útiles; Lm4 (serotipo 1/2a), que se aisló en el punto 8, correspondiente al suelo del lavadero de los carros de curado, y finalmente, Lm5 (serotipo 1/2b), que se aisló en el punto 10, correspondiente al carro de velitas. La identificación del serotipo molecular y pulsotipo se llevaron a cabo en el Departamento de Tecnología de los Alimentos, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de Madrid.

Las cepas liofilizadas, almacenadas a 4 °C, se recuperaron en TSB a 30 °C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las cepas se sembraron por agotamiento en TSA y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. A partir de este cultivo, se resembraron colonias aisladas en tubos inclinados de TSA, con el fin de obtener cultivos

stock. Éstos se incubaron a 37 °C durante 24 horas y posteriormente se almacenaron a una temperatura de 4 °C durante un máximo de un mes.

### ***1.3. Preparación del inóculo y formación de biofilms en discos de acero inoxidable***

La preparación del inóculo y posterior formación de biofilms, de las tres cepas salvajes de *L. monocytogenes*, se realizó como se ha indicado en el Capítulo VI sección 1.3. Los biofilms se formaron en condiciones estáticas, con un período total de incubación de una semana, con una serie de pasos de lavado y renovación de nutrientes, mediante la adición de más medio de cultivo a las 48 horas + 24 horas + 24 horas + 72 horas. Estas condiciones fueron fijadas como las más adecuadas para la formación de biofilms de *L. monocytogenes*.

### ***1.4. Agentes limpiadores***

El producto empleado, para el tratamiento de limpieza enzimática, fue generado *ex novo*. Incluyó proteasas, amilasas y extractos vegetales. Previamente a su uso, éste se diluyó para obtener una concentración del 3 %. Para el estudio sobre la evaluación de los ciclos de tratamiento, se emplearon 4 productos enzimáticos distintos (Enzimático 1, Enzimático 2, Enzimático 3 y Enzimático 4), con diferentes formulaciones, que incluían proteasa, amilasa, lipasa, entre otros. Todos ellos también se diluyeron para obtener una concentración del 3 %.

El producto empleado para el tratamiento de limpieza convencional fue un detergente alcalino clorado (Clorajet, iTram Higiene, Vic, España), puesto que este tipo de productos se emplean mucho en la industria alimentaria en los últimos tiempos. Éste consistía en álcalis, hipoclorito de sodio, agentes secuestrantes y finalmente tensoactivos iónicos y no iónicos. El producto se diluyó para obtener una concentración del 3 %.

Las pruebas se realizaron mediante la adaptación de la norma internacional UNE-EN 13697:2015, en relación a la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los

desinfectantes químicos utilizados en la industria alimentaria. Por esta razón, se utilizó agua dura para diluir los productos al 3 %. El agua dura se obtuvo mediante una mezcla de 3 ml de Solución A [consta de 19,84 g de  $MgCl_2$  (Sigma, Madrid, España) y 46,24 g de  $CaCl_2$  (Sigma, Madrid, España) por cada 1000 ml de agua destilada], 4 ml de solución B [consta de 35,02 g de  $NaHCO_3$  (Sigma, Madrid, España) por 1000 ml de agua destilada], 100 ml de solución interferente [consta de 1,5 g de albúmina sérica bovina (BSA, ) por cada 100 ml de agua destilada] y, finalmente, se enrasó con 500 ml de agua destilada estéril en un matraz aforado. Todas las soluciones se esterilizaron, previamente a la mezcla, por filtración con membrana (Millex-GP 0,22  $\mu m$ , Merck, Barcelona, España).

### **1.5. Evaluación de los ciclos de tratamiento enzimático**

Previamente a la realización de la comparativa entre el tratamiento enzimático y el tratamiento con alcalinos clorados, se realizó un estudio para ver el efecto que tenía el incremento de ciclos de tratamiento enzimático en la disgregación de biofilms. Para esta prueba se empleó la cepa de referencia *L. monocytogenes* CECT 935, con la que se formaron biofilms maduros (ver sección 1.3.). Tras su incubación, se evaluaron 4 diferentes productos enzimáticos y 3 diferentes ciclos de tratamiento. Primeramente, los biofilms de *L. monocytogenes* CECT 935, formados en las superficies, se lavaron dos veces con 3 ml de agua destilada estéril, con el objetivo de eliminar las células no adheridas a la superficie y posteriormente, se colocaron en un frasco estéril. A continuación, se introdujeron 3 ml del producto de limpieza correspondiente, en los frascos que contenían las diferentes muestras. Éste fue el volumen mínimo calculado para cubrir todo el disco. Posteriormente, se evaluó el efecto que tenía un lavado, dos lavados consecutivos y finalmente tres lavados consecutivos en la disgregación de biofilms maduros de *L. monocytogenes*. El objetivo fue el de establecer un protocolo posterior, en función de su efecto.

Para ello, se introdujeron 3 ml del producto enzimático y se llevó a 50 °C durante 30 minutos (Enzimático 1 y Enzimático 2) y 50 °C durante 30 minutos + 30 °C durante 15 min, para potenciar la acción de la enzima lipasa (Enzimático 3 y Enzimático 4). Esto se consideró el primer ciclo, por lo que parte de las muestras se evaluaron en este punto (ver

sección 1.7. para ver metodología de cuantificación de las células remanentes en la superficie). Este proceso se repitió para el segundo ciclo, donde las muestras se colocaron en otro frasco estéril y se introdujeron 3 ml de producto enzimático, realizándose por tanto el segundo ciclo y retirando muestras para su cuantificación posterior. Se repitió la operación para un tercer ciclo de tratamiento y, finalmente, se pasó a cuantificar las células remanentes en superficie después de los tres lavados consecutivos con el tratamiento enzimático.

***1.6. Procedimiento de limpieza final. Comparativa entre el tratamiento enzimático y el tratamiento con alcalinos clorados.***

Para la comparativa, entre ambos tratamientos, se procedió a lavar los discos dos veces con 3 ml de agua destilada estéril, una vez transcurrido el tiempo de incubación. Posteriormente se colocaron en un frasco estéril. A continuación, se introdujeron 3 ml del producto de limpieza correspondiente en los frascos que contenían las muestras. El tratamiento con el alcalino clorado se realizó siguiendo las instrucciones de uso expuestas en la ficha técnica del producto, que establecían 15 minutos de tratamiento a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tratamiento, la muestra se enjuagó con 3 ml de agua destilada estéril y se procedió a neutralizar el efecto del desinfectante y posteriormente, a la cuantificación de las células remanentes en el biofilm descritos en el siguiente punto. Contrariamente, el tratamiento enzimático se realizó mediante 3 ciclos de tratamiento consecutivos. Para ello, las muestras previamente lavadas dos veces con 3 ml de agua se colocaron en un frasco estéril y, a continuación, se introdujeron 3 ml del producto enzimático, llevándose a 50 °C durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, las muestras se retiraron, se enjuagaron con 3 ml de agua destilada estéril y se colocaron en otro frasco estéril. A continuación, se añadieron de nuevo 3 ml de producto enzimático y se volvió a tratar a 50 °C durante 20 minutos. Esto se repitió una vez más para obtener un total de 3 tratamientos seguidos. Una vez finalizado, se procedió a la cuantificación de las células remanentes en la superficie.

### **1.7. Cuantificación de biofilms por sistema TEMPO**

Una vez realizados los periodos de limpieza de las superficies, los discos se introdujeron en un frasco estéril que contenía perlas de vidrio y 10 ml de solución neutralizante. Los frascos conteniendo las muestras se agitaron en vórtex durante 1,30 minutos a 40 Hz, para desprender las células adheridas de la superficie y así poder cuantificarlas. La suspensión resultante se diluyó decimalmente en TSS y se transfirió 1 ml de la dilución correspondiente a un vial del sistema TEMPO, previamente hidratado, con 3 ml de agua destilada estéril. El vial se agitó en vórtex, para homogeneizar su contenido, y se transfirió, a través de la unidad de llenado de TEMPO, a la tarjeta de lectura, para su posterior incubación a 30 °C durante 48 horas. Los resultados se calcularon para obtener log (UFC cm<sup>-2</sup>).

### **1.8. Análisis estadístico**

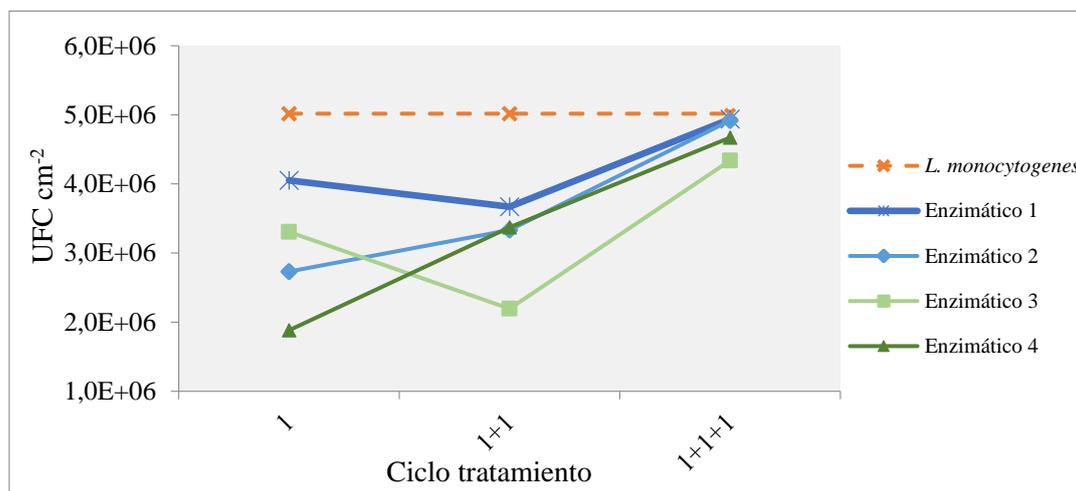
Para verificar las condiciones previas a la realización de un análisis de variancia, se realizó una comprobación de la normalidad en las poblaciones estudiadas, mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Una vez cumplidas las condiciones de la prueba, los resultados fueron evaluados por análisis de variancia (ANOVA), con un contraste *a posteriori* mediante la prueba de Tukey.

Para todo ello, se utilizó el paquete de software estadístico SPSS Statistics IBM 23. Un  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico de la variancia fue utilizado para la comparación entre las tres diferentes cepas empleadas en el estudio así como también para el tratamiento.

## 2. Resultados y discusión

### 2.1. Establecimiento de ciclos de lavado para optimizar la acción enzimática

La evaluación de los ciclos, en los que aplicar el tratamiento enzimático, se realizó como estudio preliminar para observar, bajo qué circunstancias, el efecto de limpieza era más efectivo. Los ciclos de tratamiento probados, en los cuatro productos enzimáticos, bajo dos condiciones distintas, para la disgregación de biofilms maduros de *L. monocytogenes* CECT 935, se muestran en la **Figura 37** (50 °C durante 30 minutos para el producto enzimático 1 y 2 y 50 °C durante 30 minutos + 30 °C durante 15 minutos para el producto enzimático 3 y 4).



**Figura 37.** Recuentos microbianos (UFC cm<sup>-2</sup>) obtenidos a partir de la cuantificación de células de *L. monocytogenes* CECT 935 despegadas del biofilm formado sobre discos de acero inoxidable después de distintos tratamientos enzimáticos a diferentes ciclos. Cada valor corresponde a la media de dos repeticiones con tres réplicas por ensayo (n = 6). El control de *L. monocytogenes* corresponde al total de células que conformaron el biofilm.

Tal y como se puede observar, parece haber una tendencia de mejora, relacionada con el aumento ciclos de tratamiento, siendo los tres ciclos consecutivos el conjunto más efectivo. De hecho, se llegó a un porcentaje final de disgregación del 98,43 %, 98,03 %, 86,51 % y 93,11 %, respectivamente; para el producto enzimático 1, 2, 3 y 4. Aunque entre la aplicación de un, dos o tres ciclos de tratamiento enzimáticos no se mostraron

diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,944$ ;  $P = 0,689$ ;  $P = 0,710$ ;  $P = 0,597$  respectivamente, para los cuatro productos enzimáticos). Se eligieron tres ciclos consecutivos de tratamiento, porque se observó una mejora substancial en el porcentaje final de eficacia

La efectividad de la limpieza de superficies, en la industria alimentaria, viene determinada por cuatro variables diferentes: la fuerza mecánica aplicada, la temperatura de aplicación, el tiempo de contacto entre el producto de limpieza y la superficie y, finalmente, la concentración del limpiador (Basso *et al.* 2017). Se ha descrito que estos factores pueden ser modificados durante el transcurso de la limpieza, cuando se emplean productos químicos, pero puede ser extrapolado a la utilización de productos enzimáticos (Guerrero-Navarro 2017). No obstante, en el presente estudio también se ha podido observar, que la efectividad de la limpieza, y con ello la disgregación de biofilms, puede estar a su vez influenciada por el número de ciclos en que se aplica el tratamiento enzimático. En este caso, al repetir tres veces el mismo ciclo, eliminar la solución de lavado e incorporar nueva solución enzimática, hacía que no se saturaran los enzimas durante la operación. Además, al añadir nuevo enzima, éste iría despegando el biofilm remanente en superficie, optimizando de esta forma el proceso de limpieza.

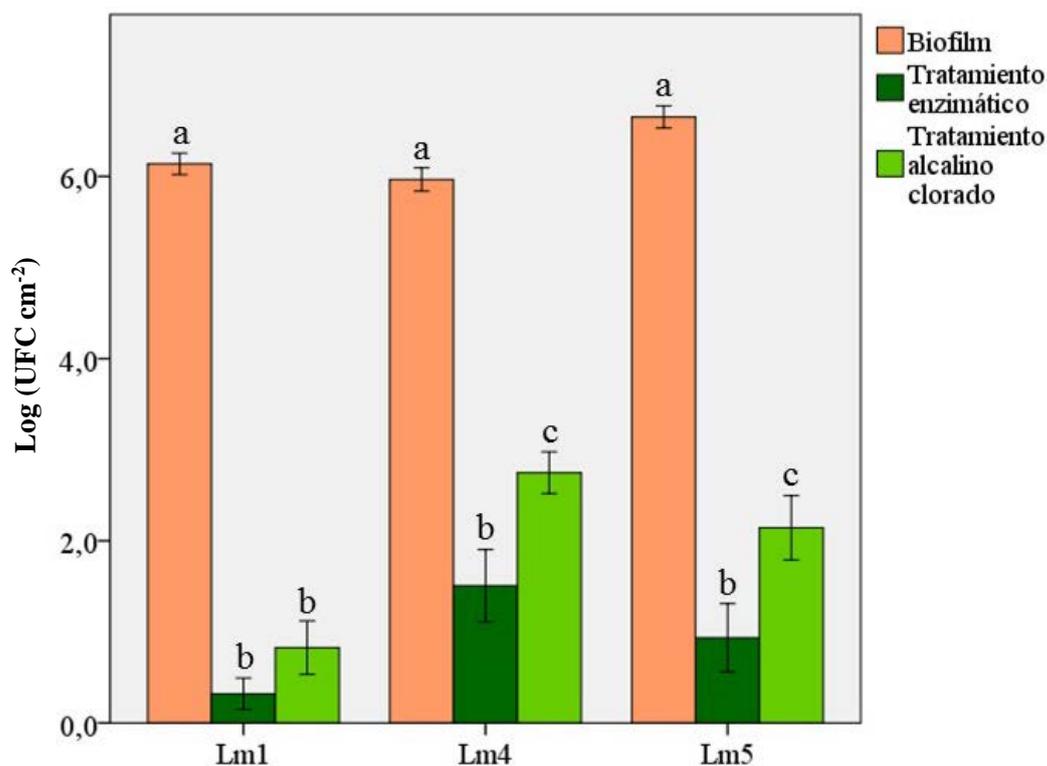
Cuando las superficies de la industria alimentaria están altamente contaminadas, a nivel microbiológico, se recomienda utilizar tratamientos de limpieza agresivos, que reduzcan notablemente la carga microbiana. Una posible estrategia agresiva podría ser el empleo de múltiples ciclos de limpieza seguidos, ya que de esta forma se debilitaría y dispersaría la estructura de los biofilms que se encuentren en las superficies, hecho que supondría que la posterior desinfección fuera más efectiva.

## **2.2. Comparación entre el tratamiento enzimático y con alcalinos clorados en la disgregación de biofilms maduros por cepas salvajes de *L. monocytogenes***

Las condiciones experimentales establecidas, para el tratamiento enzimático, se basaron en el previo estudio, donde se determinó que tres ciclos consecutivos de tratamiento aumentaban el porcentaje de eficacia de disgregación de *L. monocytogenes* CECT 935. En el presente estudio comparativo se evaluó un producto enzimático, de nueva

formulación, con un producto alcalino clorado, para observar la eficacia en la disgregación de biofilms maduros, generados por cepas salvajes de *L. monocytogenes* obtenidas en la industria alimentaria bajo estudio (**Figura 38**). Tal y como se puede observar, la cepa Lm1 presenta diferencias estadísticamente significativas, entre el biofilm maduro, y ambos tratamientos ( $P < 0,05$ ), aunque a su vez no se demostraron diferencias significativas entre el tratamiento enzimático y el tratamiento con alcalino clorado aplicados en las superficies ( $P = 0,220$ ). Contrariamente, para las cepas Lm4 y Lm5 ambos tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,011$ ;  $P = 0,026$ ; respectivamente para Lm4 y Lm5) entre ellos, a la vez que con el biofilm maduro ( $P < 0,05$ ). Esto indica, que la efectividad del tratamiento aplicado, es dependiente de la cepa con la que se ha producido el biofilm, lo que coincide con lo observado por otros autores tales como Ortiz *et al.* (2014a). Estos autores observaron, que determinadas concentraciones de cloruro de benzalconio, podían disminuir la producción de biofilms de *L. monocytogenes*, pero que difería entre cepas.

En el presente estudio se podría sugerir, que las diferencias en cuanto al tratamiento, pueden ser debidas a la cantidad de matriz que produce la cepa, ya que, tal y como se ha demostrado en el anterior capítulo, la producción de biofilms varía entre las mismas. En este caso, podría ser que la cepa Lm1 hubiera generado una ECM en menor proporción que las cepas Lm4 y Lm5, haciendo que el tratamiento enzimático y el tratamiento con alcalinos clorados, no difieran significativamente. Sin embargo, las cepas Lm4 y Lm5 podrían haber generado una matriz más robusta haciendo, en este caso, que el tratamiento enzimático funcionara mejor que el tratamiento con alcalinos clorados. Las enzimas podrían haber desestructurado y disgregado mejor la matriz del biofilm. No obstante, para poder comprobar este hecho, se requiere un posterior estudio más profundo sobre la matriz producida, tanto a nivel de composición como a nivel estructural.



#### Cepas *Listeria monocytogenes*

**Figura 38.** Recuentos microbianos (log UFC cm<sup>-2</sup>) obtenidos a partir de la cuantificación de biofilms maduros, de las tres cepas de *L. monocytogenes* (Biofilm) y de las células de *L. monocytogenes* remanentes en la superficie, después de los tratamientos aplicados. Las barras de error representan el error estándar de la media. <sup>a-c</sup> Las barras que, por cepa, carecen de un superíndice común, difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

La efectividad que tienen diferentes formulaciones enzimáticas en la disgregación de biofilms monoespecie o multiespecie de *L. monocytogenes*, así como de otros microorganismos, está siendo investigada por algunos autores (Lequette *et al.* 2010; Molobela *et al.* 2010; Araújo *et al.* 2017). No obstante, los modelos de formación empleados son los basados en tiempos cortos de incubación, lo que no produce un biofilm maduro y, por tanto, no se traduce en un resultado aplicable a nivel industrial, sino en una orientación. En este sentido, Rodríguez-López *et al.* (2017a) estudiaron el efecto de diferentes combinaciones enzimáticas, destacando entre ellas la ADNasaI, la celulasa y la pronasa, en combinación con el cloruro de benzalconio sobre biofilms mixtos, entre *L. monocytogenes* y *E. coli*. En el estudio se demostró que el tratamiento más efectivo, contra este biofilm mixto, fue el que se obtuvo utilizando la ADNasaI seguido de la pronasa y celulasa, consiguiéndose una disgregación alrededor de 2 log UFC cm<sup>-2</sup>. Rodríguez-López *et al.* (2017b), siguiendo la misma línea de investigación, demostraron

que la aplicación secuencial de pronasa, en primer lugar, y cloruro de benzalconio a dosis apropiadas, en segundo lugar, representaba una estrategia atractiva para el control de patógenos, en las superficies de acero inoxidable. En este caso, se demostró tener mayor eficacia el conjunto formado por una proteasa y un biocida, lo que a su vez tiene sentido, ya que los biofilms producidos por *L. monocytogenes*, tal y como se ha discutido en anteriores capítulos, generan una matriz que está formada en su mayoría por compuestos proteicos (Colagiorgi *et al.* 2016). Diferentemente, en el estudio llevado a cabo por Wang *et al.* (2016), se demostró que biofilms de *Salmonella* spp., formados bajo condiciones similares a las que se pueden encontrar en ambientes de procesamiento cárnico, un tratamiento de limpieza enzimático con celulasa, alcanzaba una mayor reducción. Ésta se estimó en un 85 % de disgregación de las células que conformaban el biofilm. Esto indica, que este tipo de bacterias, tienden a formar biofilms cuya matriz posee componentes, en su mayoría hidrocarbonados, de la misma forma que *Pseudomonas* spp. produce matrices compuestas por alginato (Nouha *et al.* 2017), *Acetobacter xylinum* produce una matriz, en su mayoría, compuesta por celulosa (Nouha *et al.* 2017) o *Legionella pneumophila* que produce estructuras amiloides (Peterson *et al.* 2018). Las diferencias encontradas, en los compuestos mayoritarios de las matrices extracelulares, y el hecho de que un tipo de enzimas posean una mayor efectividad por un tipo de microorganismo en concreto, revelan la importancia de conocer de qué compuestos están formadas las matrices de los biofilms. Conociendo este punto, se podrían desarrollar estrategias de limpieza y desinfección adaptadas, no solo al tipo de industria alimentaria, sino también en base al tipo de microbiota mayoritaria que se encuentra en la superficie.

Estudios previos también han observado que, el empleo de agentes alcalinos para tratamientos de limpieza de biofilms, también es efectivo. Por ejemplo, da Silva Fernandes *et al.* (2015b) observaron que, el uso de alcalinos clorados, como agentes de limpieza y desinfección en un solo paso, reducían de forma significativa los recuentos de biofilms formados por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, indicando que la acción detergente es completamente necesaria, para la eliminación de la materia orgánica y la matriz producida por los microorganismos, lo que posteriormente facilita la eliminación de las células mediante el desinfectante. Siguiendo esta misma línea de investigación, da Silva Fernandes *et al.* (2015a) en un posterior estudio, indicaron que, en biofilms mixtos entre estos dos microorganismos y *L. monocytogenes*, este tipo de alcalinos clorados tenían también una efectividad elevada. No obstante, otros autores

señalan que no se produce un despegue completo del biofilm formado (Kim *et al.* 2018). Estos últimos resultados concuerdan con los mostrados en el presente estudio, que han demostrado ser capaces de despegar cierta cantidad de células, que conformaban estas estructuras, pero sin llegar a tener una efectividad completa.

Los porcentajes de efectividad obtenidos en los dos tratamientos, para las diferentes cepas empleadas en el estudio, se resumen en la **Tabla 14**. Cabe destacar que el estudio se ha realizado con biofilms maduros, por lo que el resultado se puede extrapolar a lo que se podría encontrar a nivel industrial.

**Tabla 14.** Porcentaje de disgregación de biofilms maduros de tres cepas de *L. monocytogenes*, aisladas de una industria cárnica, obtenidos después de la aplicación de dos distintos tratamientos de limpieza aplicados sobre superficies de acero inoxidable. Cada valor corresponde a una media de tres repeticiones realizadas en tres días separados ( $n = 9$ ), calculándose a su vez el error estándar de la media.

<i>L. monocytogenes</i>	% disgregación biofilms	
	Tratamiento enzimático	Tratamiento alcalino clorado
Lm1	94,77 ± 2,82	86,53 ± 4,79
Lm4	74,75 ± 6,66	53,94 ± 3,85
Lm5	85,93 ± 5,64	67,77 ± 5,30

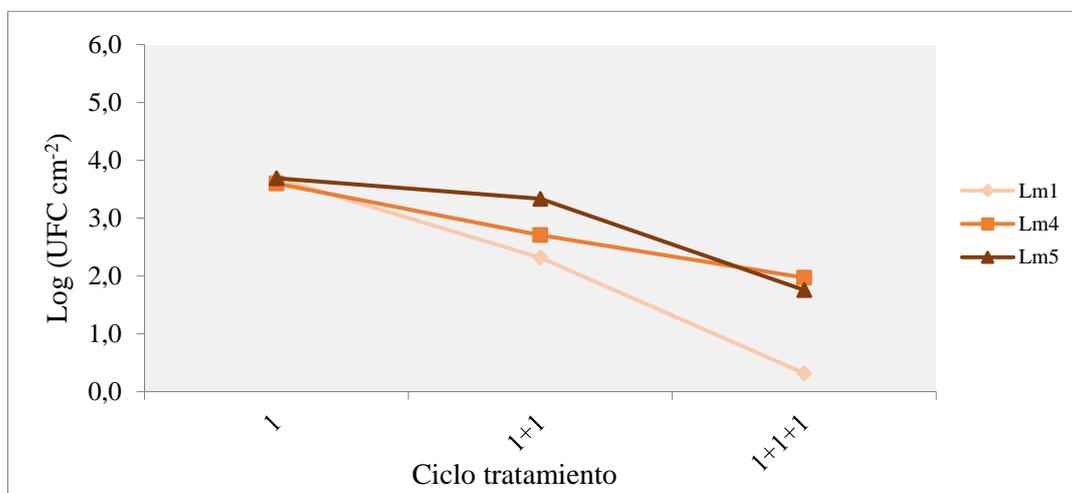
El porcentaje máximo encontrado fue para la cepa Lm1, después de un tratamiento enzimático, que consiguió despegar un 94,77 %. Para la cepa Lm4, el tratamiento enzimático fue un 20,8 % más efectivo, en cuanto a disgregación, que el tratamiento con los alcalinos clorados, de forma similar a la cepa Lm5, que lo fue en un 18,16 %. Aun obteniendo altos porcentajes de eficacia, sigue habiendo un gran número de células residuales que conforman el biofilm. No obstante, al aplicar el tratamiento enzimático, lo que se ha realizado es desestructurar y desestabilizar la estructura, siendo capaz de despegar una gran parte de células que lo conforman, y que así, posteriormente, sea más fácil poder desinfectar. En el momento en que se desestabiliza y se rompe la estructura, la aplicación de desinfectantes se verá mucho más potenciada, ya que no se encontrarán con una matriz que impide su penetración. En trabajos posteriores, sería interesante profundizar en este aspecto y estudiar el efecto desinfectante posterior al tratamiento de

limpieza. De esta forma, con un modelo de formación de biofilms maduros robusto y la elección de una metodología para poder cuantificarlos, se podría llegar a emplear como base, para la validación de tratamientos de limpieza y desinfección, de una forma más representativa de las condiciones reales en industria.

En estos momentos y debido en cierta parte a presiones sociales, la industria alimentaria apuesta claramente a la mejora del diseño higiénico de las líneas de procesado, para mitigar el riesgo de contaminación microbiana de los alimentos, con respecto a la preocupación existente por el medio ambiente (Faille *et al.* 2017). De esta forma, hay un esfuerzo activo en la investigación de nuevos revestimientos para las superficies, así como para encontrar productos alternativos para la limpieza a nivel industrial. Mientras se mantengan unos altos estándares de higiene, cualquier opción propuesta para reducir la energía, los productos químicos o el agua utilizada son muy buscados en la actualidad. En este sentido, se ha propuesto, que la modificación de ciertos materiales, puede jugar un papel clave en la adhesión microbiana y, posteriormente, en su condición higiénica. Por ejemplo, la modificación del acero inoxidable incluyéndole silicio, suponía que los protocolos de limpieza y desinfección, mediante el uso de cloro, revelarían una reducción en los recuentos microbianos mucho más efectiva (Moreira *et al.* 2016). Fialho *et al.* (2017) evaluaron el efecto sobre la adhesión microbiana y posterior formación de biofilms, sobre superficies de acero inoxidable y polietileno, donde se habían incluido nanopartículas de plata. En el estudio se señaló que no hubo diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a la adhesión entre las superficies no modificadas con las que sí que lo estaban, obteniendo unos resultados parecidos. Jang *et al.* (2018) demostraron que la modificación del acero inoxidable, mediante grabados electroquímicos, inhibía, de forma eficaz, la adhesión bacteriana de *E. coli* y *S. aureus*. No obstante, las nuevas propuestas de diseño de materiales y equipos, siempre deberán ir combinadas con operaciones de limpieza y desinfección. Por esta razón es tan importante la búsqueda de alternativas para estas operaciones, que minimicen la carga de agua, y todos los impactos ambientales de las mismas, ayudando así a conservar el medioambiente.

### 2.3. Soluciones de lavado y efecto desinfectante

El efecto desinfectante se examinó en las soluciones de lavado empleadas, durante el tratamiento de limpieza aplicado, en las superficies. De esta forma, se observó si en el despegue de las células que conformaron los biofilms de *L. monocytogenes* se había producido, además, una eliminación del patógeno. En el caso del tratamiento enzimático aplicado, no se produjo una eliminación completa de la bacteria, contrariamente a los resultados obtenidos en el tratamiento con el detergente alcalino clorado, el cuál demostró que, las células de *L. monocytogenes* despegadas del biofilm maduro, eran también eliminadas. Tal y como se muestra en la **Figura 39**, a medida que los ciclos de tratamiento van aumentando, la cantidad de bacterias despegadas es menor, lo que se puede atribuir a que va quedando menor proporción de bacterias adheridas a la superficie. No obstante, tal y como se ha indicado anteriormente, su efectividad global aumenta cuando más ciclos de tratamiento se han realizado.



**Figura 39.** Recuentos microbianos (log UFC cm<sup>-2</sup>) obtenidos en las soluciones enzimáticas de lavado en el transcurso de los diferentes ciclos de tratamiento. El recuento representa las células despegadas de biofilms maduros de las tres cepas salvajes de *L. monocytogenes*. Cada valor corresponde a la media de tres repeticiones con tres réplicas por ensayo (n = 9).

La carga de microorganismos obtenidos en las soluciones de lavado del tratamiento enzimático fue elevada, en comparación con lo encontrado en el tratamiento químico que fue una letalidad del 100 %, 93,2 % y 98,05 %, respectivamente para Lm1, Lm4 y Lm5.

De esta forma, se demostró la alta capacidad que tienen los alcalinos clorados en la eliminación de este patógeno. Esto coincide con los resultados de Aarnisalo *et al.* (2007b), que indicaron la evidente susceptibilidad de diferentes cepas de *L. monocytogenes* a este tipo de agentes limpiadores y desinfectantes. No obstante, hay que tener en consideración que actualmente existe una necesidad inmediata de mitigar el impacto ambiental de las operaciones de limpieza y, por esta razón, se deberían emplear detergentes y desinfectantes alternativos, que ayuden a proteger el medio ambiente, así como también reducir el consumo de agua y energía (Faille *et al.* 2017).

## **VIII. Discusión integradora**



Las autoridades públicas, los diferentes integrantes de la cadena alimentaria y los consumidores, están altamente preocupados por la inocuidad de los alimentos. La contaminación microbiológica de los mismos, considerada desde hace mucho tiempo como uno de los principales desencadenantes de enfermedades transmitidas por los alimentos, supone un problema más que evidente (Faille *et al.* 2017). Una de las principales vías de contaminación, de los productos alimentarios, es la contaminación cruzada por biofilms residentes en las superficies industriales. Es por esta razón que hay una constante evaluación microbiológica de éstas, para conocer su estado higiénico (Møretrø y Langsrud 2017).

Los trabajos que acompañan a esta tesis, han tratado de contrastar y simular varios aspectos importantes para la industria alimentaria. Por una parte, la evaluación de la microbiota residente en superficies industriales, mediante un sistema de muestreo integrado en las mismas, permitiendo la obtención de resultados, que reflejan una realidad más próxima. La elección del método de muestreo a emplear, en la industria alimentaria, suele estar basado en metodologías tradicionales, aunque en estos momentos se deberían de buscar métodos rápidos, económicos y de fácil aplicación en el campo (Martinon *et al.* 2012; Branck *et al.*, 2017). Se ha demostrado, que el método de muestreo, tiene un gran efecto en la obtención de los microorganismos residentes en la superficie y que ésta dependerá de una serie de factores, entre los que se destacan: las propiedades del microorganismo objetivo, el lugar de muestreo, el método de desprendimiento y la metodología para recuperar los microorganismos (Moore y Griffith 2002; Montañez-Izquierdo 2013). El muestreo debería diseñarse para un entorno industrial específico, ya que, por el momento, no es posible emplear una metodología universal óptima, para todas las condiciones (Møretrø y Langsrud 2017). En este sentido, se necesitan métodos innovadores con los que se obtengan resultados más representativos del entorno industrial, para así poder controlar mejor la contaminación microbiológica, que pueda venir dada por equipos y superficies de trabajo de la industria alimentaria (Ismail *et al.* 2013). En el presente estudio, se ha demostrado que la integración de los sensores SCH, como partes constitutivas de la superficie y consecuentemente puntos de muestreo directo, han ayudado a determinar, de una forma más realista, diferentes poblaciones microbianas residentes en las superficies industriales. En este sentido, no se ha empleado una metodología para la obtención de muestras indirectas, como por ejemplo los hisopos. Esto se debe a que no hay evidencias científicas, que aseguren tener una recuperación

completa de células, que conforman los biofilms (Fontecha-Umaña 2014). Ésta es una necesidad a escala industrial, pudiendo perderse parte de la muestra y, por tanto, subestimar resultados. En este caso, la no pérdida de muestra es debida a que la evaluación del sensor es completa. De esta forma, se pueden desarrollar estrategias efectivas para garantizar altos estándares higiénicos, con garantía de evaluación completa.

Por otra parte, centrado en *L. monocytogenes*, uno de los patógenos más relevantes actualmente (EFSA-ECDC 2017), se ha creado un sistema modelo, para poder reproducir biofilms *in vitro* de este patógeno, en su estado maduro. De esta forma se puede plasmar lo que se encuentra en la realidad industrial. Para la creación de este modelo, se evaluó el impacto de diferentes tiempos de incubación y renovación de medio de cultivo, en la formación de biofilms de *L. monocytogenes*. Los resultados demostraron, que el mejor período inicial de incubación, fue el establecido tras 48 horas de incubación, en comparación con 24 horas o 72 horas. El patógeno necesita como mínimo este tiempo, para poder unirse de una forma irreversible a la superficie y empezar la formación de la estructura (Norwood y Gilmour 1999; Moltz y Martin 2005). Este hecho es verdaderamente preocupante a nivel industrial, cuando la producción se para en fin de semana. En este periodo *L. monocytogenes* podría empezar a consolidar el biofilm. El crecimiento máximo y obtenido bajo las diferentes condiciones *in vitro* probadas, fue tras una semana de incubación, con diferentes lavados y renovación de nutrientes (48 h + 24 h + 24 h + 72 h). En este caso se alcanzó una cantidad total de células de 7,25 log (UFC cm<sup>-2</sup>) y una tasa de supervivencia celular del 94,47 %. Se observó también una estructura, que incluía ciertos indicadores de madurez, tales como una red tridimensional de células superpuestas, con huecos intersticiales, similar a morfotipos tipo panal, ya descritos para *L. monocytogenes* (Marsh *et al.* 2003; Guilbaud *et al.* 2015). La creación de modelos de formación de biofilms, en su etapa madura, es completamente crucial, para poder comprender de qué manera reproducirlos a escala laboratorio, de una forma que refleje la realidad industrial. Así, se podría utilizar, como estándar para validar tratamientos de limpieza y desinfección, previamente a su aplicación en la industria alimentaria, sin que su efecto sea menor al esperado.

Posterior a la creación del sistema modelo, se produjeron biofilms con 17 cepas diferentes de *L. monocytogenes*, tanto de colección, como aisladas de industria, para poder observar, por una parte, la formación de biofilms mediante el modelo, y por la otra, para comparar

diferentes metodologías para su recuento, con la intención de establecer unas condiciones estándar de formación y posterior cuantificación de las células que los conforman. La búsqueda de métodos de cuantificación de biofilms, que sean fiables y realistas, es completamente necesaria, para la obtención de resultados representativos. Es por esta razón, que se quiso comparar cinco métodos, que fueron: el recuento convencional en placa, TEMPO, DEM, VIDAS y qPCR, para la cuantificación de biofilms de *L. monocytogenes*. En los resultados obtenidos, se observó que, dependiendo de la producción de la matriz que engloba las células del biofilm, la recuperación de las mismas puede ser menor y, por lo tanto, si se trata de un método indirecto, los recuentos microbianos pueden subestimarse, siendo, por tanto, DEM, la mejor metodología, al poder observar y cuantificar a partir de la estructura. No obstante, ésta es una técnica costosa y laboriosa, que implica un constante esfuerzo por parte del técnico (Fuster-Valls *et al.* 2008). Es por esta razón, al igual que por ser rápido y tener una alta fiabilidad, que se eligió TEMPO como método de cuantificación del sistema modelo.

Una vez establecido el modelo de formación, recuperación y cuantificación de biofilms por *L. monocytogenes* a nivel *in vitro*, se procedió a la comparación de dos diferentes productos, para la eliminación de cepas salvajes de este patógeno, aisladas de la industria colaboradora. De esta forma, se observaría un efecto, que se puede asemejar más al que se encontraría si se aplicara en el entorno industrial. Muchos desinfectantes, tal como son empleados en la industria alimentaria, son ineficaces frente a la eliminación de biofilms. Es por esta razón, que el desarrollo de alternativas que sustituyan o complementen su uso tradicional en la industria alimentaria, se ha convertido en una necesidad actual (Srey *et al.* 2013). De entre ellas, una importante sería el empleo de detergentes enzimáticos, que han demostrado mejorar la eficacia del desprendimiento de biofilms en superficies (Stiefel *et al.* 2016b). Los resultados obtenidos demostraron un porcentaje de desapego de estas estructuras, que osciló entre 75-95 %, en función de la cepa, revelando ser una potente herramienta a emplear como agente de limpieza. Estos resultados, además, concuerdan con lo previamente indicado por otros autores (Lequette *et al.* 2010; Molobela *et al.* 2010; Araújo *et al.* 2017). Es precisamente la capacidad que tienen éstos, por romper la estructura producida, disgregándola y haciéndola más vulnerable a los microorganismos frente a la posterior desinfección. No obstante, es interesante resaltar, que la eficacia de desapego de biofilms maduros de *L. monocytogenes*, obtenida en el presente estudio, podría reflejar valores más reales, una vez se aplicaran a nivel industrial. La

generalización, en un futuro, de estos tratamientos en la industria colaboradora, podría reforzar los resultados obtenidos en este estudio, así como ver si el modelo es robusto y representativo del entorno industrial, cuando hay presencia de estas estructuras en su estado maduro.

Los biofilms en la industria alimentaria constituyen un serio problema económico y de salud pública, éste último siendo verdaderamente crucial (Galié *et al.* 2018). La construcción de un modelo ecológico a escala de laboratorio, similar el encontrado en las empresas, para su evaluación y posterior eliminación, supone una necesidad intrínseca de la industria alimentaria, para poder establecer unas medidas de control adecuadas basadas en datos representativos.

## **IX. Conclusiones**



1. El uso de un detector de biofilms en superficies, para la selección de puntos de la industria a muestrear, supone una gran ventaja en la investigación de los puntos críticos de una superficie. Su empleo habitual puede permitir delimitar las zonas críticas y evaluar la eficacia de los procesos de higienización de las superficies.
2. El empleo de sensores SCH, como sistema de muestreo real de superficies para las industrias alimentarias, y su posterior análisis, para determinar diferentes grupos microbianos, permite realizar un recuento real de la contaminación de las superficies, una evaluación de la microbiota residente y determinar el estado higiénico de una instalación, con relativa facilidad.
3. Con el empleo de un detector de biofilms para superficies y el análisis microbiológico de los SCH, se determinó que las zonas con mayor grado de contaminación microbiológica, fueron los suelos, tanto del lavadero de carros de carne fresca, el de carne curada y el de la cámara de oreo de canales, así como el armario de útiles. Esto puede ser debido al alto movimiento de personas y producto, que hay en estas zonas, así como a las condiciones ambientales de elevada humedad. Por el contrario, el resto de áreas muestreadas presentaron niveles microbiológicos claramente inferiores.
4. Los grupos microbianos, presentes en un mayor número, fueron los microorganismos aerobios mesófilos totales, las bacterias del ácido láctico y los mohos y las levaduras. No obstante, la evolución de la contaminación, considerando los datos medios mensuales, indican dos elementos que influyen en la variación de los recuentos: estación del año y carga de trabajo.
5. Se ha apreciado una relación entre los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales y la presencia de *L. monocytogenes*, en las superficies de la industria alimentaria. Esta relación es compleja observando que, en algunos puntos, la presencia del patógeno se produce con alta carga de bacterias acompañantes y, en otras, justamente lo contrario. Por ello, se han establecido tres teorías que justifiquen esta situación. Serán necesarios, por tanto, nuevos estudios que demuestren cuál de ellas se puede confirmar.

6. El modelo de formación de biofilms desarrollado demuestra, que *L. monocytogenes*, necesita unas condiciones de incubación específicas, para garantizar la formación de un biofilm maduro y complejo. Para ello, es necesario una semana de trabajo, con diferentes lavados y renovación de nutrientes. En estas condiciones, se ha demostrado que las proteínas y los carbohidratos, que componen la matriz, están presentes y en cantidades importantes. En las condiciones ensayadas no se ha observado, que la adición de una capa proteica aplicada a la superficie de los materiales, como suciedad residual, cause un crecimiento significativo de *L. monocytogenes* y su posterior formación de biofilms.
7. La generación de un modelo *in vitro*, para la formación de biofilms, permite simular lo que ocurre en entornos industriales, ayuda a los investigadores a recrear, a escala de laboratorio, situaciones reales, comprender cómo se forman y crecen los biofilms y poder evaluar diferentes productos que demuestren su eficacia real en la eliminación de los biofilms en la industria alimentaria. Además, la metodología recogida en este trabajo, podría ser aplicada, de igual forma, para otros microorganismos potencialmente formadores de estas estructuras, relevantes para los entornos industriales.
8. El método para la cuantificación de células que conforman biofilms de *L. monocytogenes*, depende de la capacidad, de cada cepa, de producción de la matriz que la englobará e incrustará en la superficie. La producción de ECM hará que el biofilm pueda ser más robusto y, por lo tanto, la recuperación de las células que lo conforman, puede ser menor. No obstante, no se ha encontrado una relación directa entre los serotipos de *L. monocytogenes* evaluados y la formación del ECM, lo que implica que es una característica individual de cada cepa.
9. El producto enzimático evaluado disgrega significativamente biofilms maduros de *L. monocytogenes*, pero es necesaria una posterior desinfección para eliminar el patógeno. Esto indica que se trata de una gran alternativa para utilizar en las industrias, como parte de los programas de limpieza y desinfección. El número de ciclos de tratamiento enzimático, aumenta la eficacia en la disgregación de biofilms de *L. monocytogenes*. El empleo de los SCH permitiría, en cada caso,

determinar el número de ciclos de aplicación del detergente enzimático. La determinación de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales, después de cada tratamiento de higienización, podría adaptar la intensidad de cada tratamiento a las necesidades reales de la industria.

10. El empleo de un detergente alcalino clorado, despegó biofilms de *L. monocytogenes* de forma significativa y fue capaz, posteriormente, de eliminar las células desprendidas. No obstante, su efecto fue significativamente menor para tres de las cepas salvajes bajo estudio. Por tanto, la evaluación a escala de laboratorio, con cepas de colección, puede proporcionar resultados diferentes a los obtenidos trabajando en condiciones similares a las de trabajo.



## **X. Bibliografia**



- Aarnisalo, K. (2007a). Equipment hygiene and risk assessment measures as tools in the prevention of *Listeria monocytogenes* - contamination in food processes. [Tesis Doctoral]. *Helsinki University of Technology*.
- Aarnisalo, K., Lundén, J., Korkeala, H., y Wirtanen, G. (2007b). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, 40(6), 1041–1048.
- AENOR (1998). ISO 11290-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.
- AENOR (2015). ISO 13697. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de superficie no porosa para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colecti.
- AFNOR (2005). Validation certificate for alternative analytical method according to standard EN ISO 16140:2003, Certificate No. BIO 12/15-09/05: TEMPO TVC – method validated for the enumeration of viable aerobic mesophilic flora in food products. France.
- Aguado, V., Vitas, A. I., y García-Jalón, I. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 341–347.
- Albuquerque, P., y Casadevall, A. (2012). *Quorum sensing* in fungi – a review. *Medical Mycology*, 100(2), 1–15.
- Alonso, A. N., Perry, K. J., Regeimbal, J. M., Regan, P. M., y Higgins, D. E. (2014). Identification of *Listeria monocytogenes* determinants required for biofilm formation. *PLoS ONE*, 9(12), 1–16.
- Álvarez-Gurrea, J. C. (2015). Evolución de la contaminación de superficies durante los procesos productivos en pymes del sector cárnico. [Tesis Doctoral]. *Universidad de la Rioja*.
- Álvarez, F., Sanz, S., y Rodríguez-Jerez, J. J. (2005). Rapid evaluation of surface sanitation by electrical measurement. *Journal of AOAC International*, 88(4), 1223–1226.
- Ammann, T. W., Bostanci, N., Belibasakis, G. N., y Thurnheer, T. (2013). Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an *in vitro* subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research*, 48(4), 517–526.
- Ammor, M. S., Michaelidis, C., y Nychas, G.-J. E. (2008). Insights into the role of *quorum sensing* in food spoilage. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1510–1525.
- Araújo, P. A., Machado, I., Meireles, A., Leiknes, T. O., Mergulhão, F., Melo, L. F., y Simões, M. (2017). Combination of selected enzymes with cetyltrimethylammonium bromide in biofilm inactivation, removal and regrowth. *Food Research International*, 95, 101–107
- Arendt, S., Rajagopal, L., Strohhahn, C., Stokes, N., Meyer, J., y Mandernach, S. (2013). reporting of foodborne illness by U.S. consumers and healthcare professionals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 3684–3714.
- Asally, M., Kittisopikul, M., Rue, P., Du, Y., Hu, Z., Cagatay, T., ... Süel, G. M. (2012). Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), 18891–18896.
- Autio, T., Keto-timonen, R., Lundén, J., Björkroth, J., y Korkeala, H. (2003). characterisation of persistent and sporadic *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and amplified fragment length polymorphism

- (AFLP). *Systematic and Applied Microbiology*, 545(4), 539–545.
- Avila-Aguero, M. L., German, G., Paris, M. M., y Herrera, J. F. (2004). Toys in a pediatric hospital: Are they a bacterial source? *American Journal of Infection Control*, 32(5), 287–290.
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., ... Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351.
- Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L., y Fønnesbech Vogel, B. (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(4):592–598.
- Barros, A. F., Nero, A., Monteiro, A. A., y Beloti, V. (2007). Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. *Food Science and Technology*, 27(4), 856–862.
- Bassler, B. L. (2002). Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, 109(4), 421–424.
- Basso, M., Simonato, M., Furlanetto, R., y De Nardo, L. (2017). Study of chemical environments for washing and descaling of food processing appliances: An insight in commercial cleaning products. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 53, 23–36.
- Beenken, K. E., Beenken, K. E., Blevins, J. S., Blevins, J. S., Smeltzer, M. S., y Smeltzer, M. S. (2003). Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infection and Immunity*, 71(7), 4206–4211.
- Berlanga, M., y Guerrero, R. (2016). Living together in biofilms: The microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–11.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C., y Meile, L. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2), 526–532.
- Besnard, V., Federighi, M., y Cappelletti, J. M. (2000). Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiology*, 17(6), 697–704.
- Black, R. E., Jackson, R. J., Tsai, T., Medvesky, M., Shayegani, M., Feeley, J. C., ... Wakelee, A. M. (1978). Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *New England Journal of Medicine*, 298(2), 76–79.
- Blackman, I. C., Frank, J. F., y Frank, F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 8(8), 827–831.
- Blagoeva, G., Milev, M., Minkova, S., Gotcheva, V., y Angelov, A. (2014). Assessment of lactic acid bacteria and enterobacteriaceae counts in bulgarian probiotic products by TEMPO<sup>®</sup> system and iso methods. *Journal of Nutritional Health y Food Engineering*, 1(5), 1–5.
- Bloomfield, S. F. (2003). Home hygiene: A risk approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206(1), 1–8.
- Bloomfield, S. F., Carling, P. C., y Exner, M. (2017). A unified framework for developing effective hygiene procedures for hands, environmental surfaces and laundry in healthcare, domestic, food handling and other settings. *GMS Hygiene and Infection Control*, 12, 1–16.
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J. P., Tsunemi, M. H., y Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35(1), 386–391.

- Bortolussi, R. (2008). Public health: Listeriosis: A primer. *Canadian Medical Association Journal*, 179(8), 795–797.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., y Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336–7342.
- Boutaga, K., Van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., y Savelkoul, P. H. M. (2005). Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45(2), 191–199.
- Brackman, G., Celen, S., Hillaert, U., van Calenbergh, S., Cos, P., Maes, L., ... Coenye, T. (2011). Structure-activity relationship of cinnamaldehyde analogs as inhibitors of AI-2 based *quorum sensing* and their effect on virulence of *Vibrio* spp. *PLoS ONE*, 6(1), 1–10.
- Brackman, G., y Coenye, T. (2015). *Quorum sensing* inhibitors as anti-biofilm agents. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 5–11.
- Branck, T. A., Hurley, M. J., Prata, G. N., Crivello, C. A., y Marek, P. J. (2017). Efficacy of a sonicating swab for removal and capture of *Listeria monocytogenes* in biofilms on stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(11), 1–10.
- Brauge, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Benezech, T., Maes, E., Guerardel, Y., y Midelet-Bourdin, G. (2016). Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix. *FEMS Microbiology Letters*, 363(2), fmv229.
- Bridier, A., Sanchez-Vizuete, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naïtali, M., y Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(PB), 167–178.
- Brightwell, G., Boerema, J., Mills, J., Mowat, E., y Pulford, D. (2006). Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1–2), 47–53.
- Brown, L. G., Hoover, E. R., Selman, C. A., Coleman, E. W., y Schurz Rogers, H. (2017). Outbreak characteristics associated with identification of contributing factors to foodborne illness outbreaks. *Epidemiology and Infection*, 145(11), 2254–2262.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., y Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3916–3923.
- Busscher, H. J., Weerkamp, A. H., Mei, H. C., Pelt, A. W. J., Jong, H. P., y Arends, J. (1984). measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), 980–983.
- Cahill, S. M., Wachsmuth, I. K., Costarrica, M. d. L., y Embarek, P. K. B. (2008). powdered infant formula as a source of *Salmonella* infection in infants. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 268–273.
- Cappitelli, F., Polo, A., y Villa, F. (2014). Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews*, 6(1–2), 29–42.
- Carpentier, B., y Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8.
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., y García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556.

- Cartwright, E. J., Jackson, K. A., Johnson, S. D., Graves, L. M., Silk, B. J., y Mahon, B. E. (2013). Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 1–9.
- Centorame, P., D'Angelo, A. R., Di Simone, F., Salini, R., Cornacchia, A., Marrone, R., ... Pomilio, F. (2017). *Listeria monocytogenes* biofilm production on food packaging materials submitted to physical treatment. *Italian Journal of Food Safety*, 6(3), 106–109.
- Chae, M. S., Schraft, H., Hansen, L. T., y Mackereth, R. (2006). Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology*, 23(3), 250–259.
- Chambless, J. D., Hunt, S. M., y Stewart, P. S. (2006). A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2005–2013.
- Chang, V. P., Mills, E. W., y Cutter, C. N. (2003). reduction of bacteria on pork carcasses associated with chilling method. *Journal of Food Protection*, 66(6), 1019–1024.
- Characklis, G. W. (1981). Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(9), 1923–1960.
- Chen, J. (2003). Contemporary monitoring methods. En Food Safety Handbook (pp.197–210). *John Wiley & Sons*, Nueva Jersey, Estados Unidos.
- Chen, M. Y., Lee, D. J., Tay, J. H., y Show, K. Y. (2007). Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2), 467–474.
- Chen, Y., Jackson, K. M., Chea, F. P., y Schaffner, D. W. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*, 64(1), 72–80.
- Chenal-Francisque, V., Lopez, J., Cantinelli, T., Caro, V., Tran, C., Leclercq, A., ... Brisse, S. (2011). World wide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerging Infectious Diseases*, 17(6), 1110–1112.
- Chew, S. C., y Yang, L. (2017). Biofilms: Microbial cities wherein flow shapes competition. *Trends in Microbiology*, 25(5), 331–332.
- Chizoba-Ekezie, F. G., Sun, D. W., y Cheng, J. H. (2017). A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 69, 46–58.
- 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(1), 22–32.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., y Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996–1006.
- Christian, R. R., Manchester, J. T., y Mellor, M. T. (1983). Bacteriological quality of fabrics washed at lower-than-standard temperatures in a hospital laundry facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2), 591–597.
- Ciccio, P. D. I., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Paludi, D., ... Ianieri, A. (2012). Review *Listeria monocytogenes*: Biofilms in food processing. *Italian Journal of Food Science*, 24, 203–214.
- Codex Alimentarius. (2003). *Food hygiene (Basic texts)*. Roma, Italia.
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., y Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens*, 6(41), 1–9.

- Colagiorgi, A., Di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S., y Ianieri, A. (2016). A look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix. *Microorganisms*, 4(22), 1–12.
- Colwell, R. R. (2000). Viable but nonculturable bacteria: A survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6(2), 121–125.
- Combrouse, T., Sadovszkaya, I., Faille, C., Kol, O., Guérardel, Y., y Midelet-Bourdin, G. (2013). Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1120–1131.
- Corbitt, A. J., Bennion, N., y Forsythe, S. J. (2000). Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Letters in Applied Microbiology*, 30(6), 443–447.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., y Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711–745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., y Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322.
- Cummins, A. J., Fielding, A. K., y McLauchlin, J. (1994). *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *Journal of Infection*, 28(1), 89–91.
- da Silva Fernandes, M., Kabuki, D. Y., y Kuaye, A. Y. (2015a). Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 5–12.
- da Silva Fernandes, M., Kabuki, D. Y., y Kuaye, A. Y. (2015b). Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 97–103.
- Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., ... Unnikrishnan, M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 545–555.
- Dauphin, G., Ragimbeau, C., y Malle, P. (2001). Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1–2), 51–61.
- Davey, M. E., y O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867.
- Davidson, C. A., Griffith, C. J., Peters, A. C., y Fielding, L. M. (1999). Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence*, 14(5), 33–38.
- de Boer, E., y Beumer, R. R. (1999). Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1–2), 119–130.
- de Cesare, A., Sheldon, B. W., Smith, K. S., y Jaykus, L.-A. (2003). Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 66(9), 1587–94.
- de Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., Cardoso, M. das G., Alves, E., y Piccoli, R. H. (2010). Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 21(4), 549–553.
- den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., ... Wiedmann, M. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of*

- Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 6), 1882–1889.
- 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(6), 1552–1561.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., y McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2950–2958.
- Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., ... Chakraborty, T. (2015). Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PLoS ONE*, 10(9), 1–14.
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387–1392.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890.
- Donlan, R. M., y Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–19.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., y Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819–3822.
- Dourou, D., Beauchamp, C. S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K. E., Smith, G. C., ... Sofos, J. N. (2011). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 262–268.
- Dunn, K. A., Bielawski, J. P., Ward, T. J., Urquhart, C., y Gu, H. (2009). Reconciling ecological and genomic divergence among lineages of *Listeria* under an “extended mosaic genome concept.” *Molecular Biology and Evolution*, 26(11), 2605–2615.
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155–166.
- EFSA-ECDC. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016.
- Eisel, W. G., Linton, R. H., y Muriana, P. M. (1997). A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. *Food Microbiology*, 14(3), 273–282.
- Eneroth, Å. S. A., Svensson, B., Molin, G., y Christiansson, A. (2001). Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. *Journal of Dairy Research*, 68(2), 189–196.
- Espinosa, L., Varela, C., Martínez, E. V., y Cano, R. (2014). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2008-2011. *Boletín Epidemiológico Semanal*, 22, 130–136.
- Evans, L. R., y Linker, A. (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 116(2), 915–924.
- Faille, C., Cunault, C., Dubois, T., y Bénézech, T. (2017). Hygienic design of food processing lines to mitigate the risk of bacterial food contamination with respect to environmental concerns. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 46(February 2017), 65–73.
- Falcó, I., Verdeguer, M., Aznar, R., Sánchez, G., y Randazzo, W. (2018). Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(January), 1–9.

- FAO. (2009). How to Feed the World in 2050. Roma, Italia.
- Farber, J. M., y Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), 476–511.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Stasiewicz, M., Vongkamjan, K., Switt, A. M., Hogg, T., ... Wiedmann, M. (2011). Diverse geno- and phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2701–2715.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., y Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150–170.
- Fialho, J. F. Q., Naves, E. A. A., Bernardes, P. C., Ferreira, D. C., dos Anjos, L. D., Gelamo, R. V., ... de Andrade, N. J. (2017). Stainless steel and polyethylene surfaces functionalized with silver nanoparticles. *Food Science and Technology International*, 24(1), 87–94.
- Fijan, S., y Šostar-Turk, S. (2010). Antimicrobial activity of selected disinfectants used in a low temperature laundering procedure for textiles. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 78(1), 89–92.
- Fink, R., Oder, M., Stražar, E., y Filip, S. (2017). Efficacy of cleaning methods for the removal of *Bacillus cereus* biofilm from polyurethane conveyor belts in bakeries. *Food Control*, 80, 267–272.
- Flemming, H. C., Neu, T. R., y Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: The “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945–7947.
- Flemming, H. C., y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., y Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575.
- Flodgaard, L. R., Dalgaard, P., Andersen, J. B., Nielsen, K. F., Givskov, M., y Gram, L. (2005). Nonbioluminescent strains of *Photobacterium phosphoreum* produce the cell-to-cell communication signal N-(3-Hydroxyoctanoyl)homoserine lactone. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2113–2120.
- Fontecha-Umaña, F. (2014). Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales. [Tesis Doctoral]. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Fox, E. M., Leonard, N., y Jordan, K. (2011). Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6559–6569.
- Franciosa, G., Maugliani, A., Scalfaro, C., Floridi, F., y Aureli, P. (2009). Expression of internalin A and biofilm formation among *Listeria monocytogenes* clinical isolates. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 22(1), 183–193.
- Frank, K. L., y Patel, R. (2007). Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infection and Immunity*, 75(10), 4728–4742.
- Fritz, B. G., Walker, D. K., Goveia, D. E., Parker, A. E., y Goeres, D. M. (2015). Evaluation of Petrifilm™ aerobic count plates as an equivalent alternative to drop plating on R2A agar plates in a biofilm disinfectant efficacy test. *Current Microbiology*, 70(3), 450–456.
- Fung, D. (1994). Rapid methods and automation in microbiology: A review. *Food Reviews International*, 10, 357–375.

- Fung, D. (2002). Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety*, 1(2), 301–307.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., y Greenberg, E. P. (1994). *Quorum sensing* in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275.
- 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(3), 308–314.
- Gabriel, A. A., Ballesteros, M. L. P., Rosario, L. M. D., Tumlos, R. B., y Ramos, H. J. (2018). Elimination of *Salmonella enterica* on common stainless steel food contact surfaces using UV-C and atmospheric pressure plasma jet. *Food Control*, 86, 90–100.
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., y Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9(May), 1–18.
- Gandhi, M., y Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1–15.
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., y Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049–1056.
- Gasnov, U., Hughes, D., y Hansbro, P. M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 851–875.
- Gerba, C. P., y Kennedy, D. (2007). Enteric virus survival during household laundering and impact of disinfection with sodium hypochlorite. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4425–4428.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., y Nychas, G.-J. (2013). Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLOS ONE*, 8(10), 77276.
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Moretro, T., ... Nychas, G. J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3), 289–309.
- Gibson, D. L., White, A. P., Snyder, S. D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., ... Kay, W. W. (2006). *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7722–7730.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... Toulmin, C. (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327(February), 812–819.
- Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyses, C., Dehaumont, P., ... Veit, P. (1998). Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *Journal of Infectious Disease*, 177(1), 155–160.
- Gounadaki, A. S., Skandamis, P. N., Drosinos, E. H., y Nychas, G. J. E. (2008). Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiology*, 25(2), 313–323.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., y Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 79–97.
- Guerrero-Navarro, A. E. (2017). Estudio de la formación y eliminación del fouling,

- biofouling y biofilms en la industria láctea. [Tesis Doctoral]. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Guilbaud, M., Coppet, P. De, Bourion, F., Rachman, C., y Dousset, X. (2005). Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2190–2194.
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., y Briandet, R. (2015). Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1813–1819.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M. F., ... Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 136–138.
- Güleç, H. A., Sarioğlu, K., y Mutlu, M. (2006). Modification of food contacting surfaces by plasma polymerisation technique. Part I: Determination of hydrophilicity, hydrophobicity and surface free energy by contact angle method. *Journal of Food Engineering*, 75(2), 187–195.
- Habimana, O., Heir, E., Langsrud, S., Åsli, A. W., y Møretrø, T. (2010). Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4557–4559.
- Halter, E. L., Neuhaus, K., y Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2), 641–647.
- Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., y Al-Ahmad, A. (2010). Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology*, 59(1), 1–7.
- Harish-Prashanth, K. V., y Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential - an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18(3), 117–131.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knöchel, S., y Molin, S. (2010). Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2271–2279.
- Harvey, J., Keenan, K. P., y Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380–392.
- Haynes, B. W., y Hench, M. E. (1965). Hospital isolation system for preventing cross-contamination by staphylococcal and pseudomonas organisms in burn wounds. *Annals of Surgery*, 162(4), 641–649.
- Hefford, M. A., D'Aoust, S., Cyr, T. D., Austin, J. W., Sanders, G., Kheradpir, E., y Kalmokoff, M. L. (2005). Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(3), 197–208.
- Heir, E., Møretrø, T., Simensen, A., y Langsrud, S. (2018). *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 275(January), 46–55.
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., y Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 235–244.
- Helloin, E., Jänsch, L., y Phan-Thanh, L. (2003). Carbon starvation survival of *Listeria monocytogenes* in planktonic state and in biofilm: A proteomic study. *Proteomics*,

- 3(10), 2052–2064.
- Hennessy, T. W., Hedberg, C. W., Slutsker, L., White, K. E., Besser-Wiek, J. M., Moen, M. E., ... Osterholm, M. T. (1996). A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. *October*, 334(20), 0–5.
- Hernandez-Milian, A., y Payeras-Cifre, A. (2014). What is new in Listeriosis? *BioMed Research International*, 2014, 1–7.
- Hernández-Puga, C. (2016). Simulación y control de biofilms portadores de “*Listeria monocytogenes*” en la industria alimentaria. [Tesis Doctoral]. *Universidad Complutense de Madrid*.
- Heukelekian, H., y Heller, A. (1940). Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology*, 40(4), 547–558.
- Hingston, P. (2013). Desiccation tolerance in *Listeria monocytogenes*: mechanisms and importance for food safety. [Tesina]. *Dalhousie University*.
- Hogan, D. A. (2006). Talking to themselves : autoregulation and *quorum sensing* in fungi. *Eukaryotic Cell*, 5(4), 613–19.
- Holah, J. T. (1995). Disinfection of food production areas. *Revue Scientifique et Technique*, 14(2), 343–63.
- Holch, A., Webb, K., Lukjancenko, O., Ussery, D., Rosenthal, B. M., y Gram, L. (2013). Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *Listeria monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2944–2951.
- Holden, M. T. G., Chhabra, S. R., De Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., ... Williams, P. (1999). *Quorum-sensing* cross talk: Isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 33(6), 1254–1266.
- Hood, S. K., y Zottola, E. A. (1995). Biofilms in food processing. *Food Control*, 6(1), 9–18.
- Hood, S. K., y Zottola, E. A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2–3), 145–153.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lise, A. D., Tasto, J., Jahnke, B., Shoemaker, R., ... Nickerson, K. W. (2001). *Quorum sensing* in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2982–2992.
- Hultman, J., Rahkila, R., Ali, J., Rousu, J., y Björkroth, K. J. (2015). Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7088–7097.
- Humphrey, T. J., Martin, K. W., y Whitehead, A. (1994). Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella enteritidis* PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiology and Infection*, 113(3), 403–409.
- Hussain, M. A., y Dawson, C. O. (2013). Economic impact of food safety outbreaks on food businesses. *Foods*, 2, 585–589.
- Ishida, T., Ikeda, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ohtake, H., y Kato, J. (2007). Inhibition of *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* by N-acyl cyclopentylamides. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3183–3188.
- Ismail, R., Aviat, F., Michel, V., Le Bayon, I., Gay-Perret, P., Kutnik, M., y Fédérighi, M. (2013). Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: A review of the literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(11), 6169–6183.

- Ivanek, R., Grohn, Y. T., Wiedmann, M., y Wells, M. T. (2004). Mathematical model of *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a fish processing plant. *Journal of Food Protection*, 67(12), 2688–2697.
- Jahid, I. K., y Ha, S.-D. (2014). The paradox of mixed-species biofilms in the context of food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 990–1011.
- Jang, Y., Choi, W. T., Johnson, C. T., García, A. J., Singh, P. M., Breedveld, V., ... Champion, J. A. (2018). Inhibition of bacterial adhesion on nanotextured stainless steel 316L by electrochemical etching. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(1), 90–97.
- Jansen, B., y Kohnen, W. J. (1995). Prevention of biofilm formation by polymer modification. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(4), 391–396.
- Janzen, M. M., Navas, J., Corujo, A., Moreno, R., López, V., y Martínez-Suárez, J. V. (2006). Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: From chromogenic media to real-time PCR. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(3), 235–247.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., y Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27(6), 710–730.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 163–173.
- Jensen, A., Thomsen, L. E., Jørgensen, R. L., Larsen, M. H., Roldgaard, B. B., Christensen, B. B., ... Ingmer, H. (2008a). Processing plant persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 254–261.
- Jensen, A., Williams, D., Irvin, E., Gram, L., y Smith, M. (2008b). A processing plant persistent strain of *Listeria monocytogenes* crosses the fetoplacental barrier in a pregnant guinea pig model. *Journal of Food Protection*, 71(5), 1028–1034.
- Jiang, Z., Neetoo, H., y Chen, H. (2011). Control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using chitosan-based antimicrobial coatings and films. *Journal of Food Science*, 76(1), 22–26.
- Jones, H. C., Roth, I. L., y Sanders, W. M. (1969). Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of Bacteriology*, 99(1), 316–325.
- Jordan, S. J., Perni, S., Glenn, S., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., ... Andrew, P. W. (2008). *Listeria monocytogenes* biofilm-associated protein (BapL) may contribute to surface attachment of *L. monocytogenes* but is absent from many field isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5451–5456.
- Jullien, C., Bénézech, T., Carpentier, B., Leuret, V., y Faille, C. (2002). Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 56(1), 77–87.
- Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., y Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 259–264.
- Kalmokoff, M. L., Austin, J. W., Wan, X. D., Sanders, G., Banerjee, S., y Farber, J. M. (2001). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 91(4), 725–734.
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential

- therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205–218.
- Katase, M., y Tsumura, K. (2011). Enumeration of microorganisms in processed soy products with an automated most probable number method compared with standard plate method. *Letters in Applied Microbiology*, 53(5), 539–545.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*, 65(11), 1811–1829.
- Keith, M. (1997). Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of *Salmonella* in Foods. *Journal of Food Protection*, 60(6), 682–85.
- Khelissa, S. O., Abdallah, M., Jama, C., Faille, C., y Chihib, N. E. (2017). Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic surfaces and strategies to overcome their persistence. *Journal of Materials and Environmental Science*, 8(9), 3326–3346.
- Kim, C. Y., Zhu, X., Herzberg, M., Walker, S., y Jassby, D. (2018). Impact of physical and chemical cleaning agents on specific biofilm components and the implications for membrane biofouling management. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 57(9), 3359–3370.
- Klančnik, A., Toplak, N., Kovač, M., Marquis, H., y Jeršek, B. (2015). Quantification of *Listeria monocytogenes* cells with digital PCR and their biofilm cells with real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 118, 37–41.
- Klapper, I., Rupp, C. J., Cargo, R., Purvedorj, B., y Stoodley, P. (2002). Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(3), 289–296.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257–260.
- Koban, I., Matthes, R., Hübner, N.-O., Welk, A., Sietmann, R., Lademann, J., ... Kocher, T. (2012). XTT assay of *ex vivo* saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*, 7(1), 1–10.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., y Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63.
- Koo, O. K., Aroonual, A., y Bhunia, A. K. (2011). Human heat-shock protein 60 receptor-coated paramagnetic beads show improved capture of *Listeria monocytogenes* in the presence of other *Listeria* in food. *Journal of Applied Microbiology*, 111(1), 93–104.
- Koo, O. K., Ndahetuye, J. B., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C., y Crandall, P. G. (2014). Influence of *Listeria innocua* on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel and aluminum surfaces. *Food Control*, 39(1), 135–138.
- Köseoğlu, V. K., Heiss, C., Azadi, P., Topchiy, E., Güvener, Z. T., Lehmann, T. E., ... Gomelsky, M. (2015). *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: Origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation. *Molecular Microbiology*, 96(4), 728–743.
- Kozak, J., Balmer, T., Byrne, R., y Fisher, K. (1996). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. *Food Control*, 7(415), 215–221.
- Krysinski, E. P., Brown, L. J., y Marchisello, T. J. (1992). Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 55(4), 246–251.
- Kumar, C. G., y Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1), 9–27.
- Kumar, R., Surendran, P. K., y Thampuran, N. (2008). Evaluation of culture, ELISA and

- PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 221–226.
- Labbate, M., Queck, S. Y., Koh, K. S., Rice, S. A., Givskov, M., y Kjelleberg, S. (2004). *Quorum sensing* - controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 692–698.
- Lade, H., Paul, D., y Kweon, J. H. (2014). *Quorum quenching* mediated approaches for control of membrane biofouling. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 550–565.
- Lambertz, S., Ivarsson, S., Lopez-Valladares, G., Sidstedt, M., y Lindqvist, R. (2013). Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from retail ready-to-eat foods, processing plants and listeriosis patients in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 186–192.
- LaSarre, B., y Federle, M. J. (2013). Exploiting *quorum sensing* to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 73–111.
- Laufer, A. S., Grass, J., Holt, K., Whichard, J. M., Griffin, P. M., y Gould, L. H. (2015). Outbreaks of *Salmonella* infections attributed to beef – United States, 1973–2011. *Epidemiology and Infection*, 143(9), 2003–2013.
- Lee, W. C., Lee, M. J., Kim, J. S., y Park, S. Y. (2001). Foodborne illness outbreaks in Korea and Japan studied retrospectively. *Journal of Food Protection*, 64(6), 899–902.
- Lelieveld, H. L. M., Mostert, M. A., Hola, J., y White, B. (2003). Hygiene in food processing. *CRC Press LLC*. Boca Ratón FL., EE.UU.
- Lelieveld, H. L. M., Mostert, M. A., y Holah, J. (2005). Handbook of hygiene control in the food industry. *Woodhead Publishing*. Boca Ratón NY., EE.UU.
- Lemon, K. P., Higgins, D. E., y Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4418–4424.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., y Faille, C. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26(4), 421–431.
- Li, Y. H., y Tian, X. (2012). *Quorum sensing* and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 12(3), 2519–2538.
- Lin, C. M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C. B., Meyer, J. D., Hall, P. A., y Doyle, M. P. (2006). Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(1), 71–79.
- Lindsay, D., y von Holy, A. (1997). Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*, 14(4), 383–390.
- Llewellyn, L. J., Evans, M. R., y Palmer, S. R. (1998). Use of sequential case-control studies to investigate a community *Salmonella* outbreak in Wales. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 52(4), 272–276.
- Lobell, D. B., Burke, M. B., Tebaldi, C., Mastrandrea, M. D., Falcon, W. P., y Naylor, R. L. (2008). Priorizing climate change adaptation needs for food security in 2030 region. *Science*, 319, 607–611.
- Longhi, C., Scoarughi, G. L., Poggiali, F., Cellini, A., Carpentieri, A., Seganti, L., ... Selan, L. (2008). Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. *Microbial Pathogenesis*, 45(1), 45–52.
- López, V., Navas, J., y Martínez-Suárez, J. V. (2013). Low potential virulence associated with mutations in the *inlA* and *prfA* genes in *Listeria monocytogenes* isolated from raw retail poultry meat. *Journal of Food Protection*, 76(1), 129–132.
- López, V., Ortiz, S., Corujo, A., López, P., Navas, J., Moreno, R., y Martínez-Suárez, J. V. (2007). Traceback identification of an ingredient (pork dewlap) as the possible

- source of *Listeria monocytogenes* serotype 4b contamination in raw chicken products. *Journal of Food Protection*, 70(6), 1513–1517.
- López, V., Ortiz, S., Corujo, A., López, P., Poza, D., Navas, J., ... Martínez-Suárez, J. V. (2008). Different contamination patterns of lineage I and II strains of *Listeria monocytogenes* in a Spanish broiler abattoir. *Poultry Science*, 87(9), 1874–1882.
- Lorenzo-Cartón, F., Orihuel-Iranzo, E., Bertó-Navarro, R., y López-Torno, C. (2011). Control de la presencia de biofilms en las industrias alimentarias. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 264, 43–47.
- Lorite, G. S., Rodrigues, C. M., de Souza, A. A., Kranz, C., Mizaikoff, B., y Cotta, M. A. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 359(1), 289–295.
- Lourenço, A., de Las Heras, A., Scotti, M., Vazquez-Boland, J., Frank, J. F., y Brito, L. (2013). Comparison of *Listeria monocytogenes* exoproteomes from biofilm and planktonic state: Lmo2504, a protein associated with biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 6075–6082.
- Lourenço, A., Rego, F., Brito, L., y Frank, J. F. (2012). Evaluation of methods to assess the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 75(8), 1411–1417.
- Lundén, J. M. (2004). Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants. [Tesis Doctoral]. *University of Helsinki*.
- Lundén, J. M., Autio, T. J., y Korkeala, H. J. (2002). Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protection*, 65(7), 1129–1133.
- Lundén, J. M., Miettinen, M. K., Autio, T. J., y Korkeala, H. J. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1204–1207.
- Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., ... Siitonen, A. (2000). An outbreak of *Listeria Monocytogenes* serotype 3a infections from butter in finland. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1838–1841.
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190–212.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., y Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53(9), 742–746.
- Mai, T. L., Sofyan, N. I., Fergus, J. W., Gale, W. F., y Conner, D. E. (2006). Attachment of *Listeria monocytogenes* to an austenitic stainless steel after welding and accelerated corrosion treatments. *Journal of Food Protection*, 69(7), 1527–32.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbroek, L., ... Helmuth, R. (2003). Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2–3), 241–249.
- Marriott, N. G., Schilling, M. W., y Gravani, R. B. (2018). Meat and poultry plant sanitation. In *Principles of food sanitation* (pp. 311–340). *Springer International Publishing*. Basel, Switzerland.
- Marsh, E. J., Luo, H., y Wang, H. (2003). A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. *FEMS Microbiology Letters*, 228(2), 203–210.
- Martínez-Gonzales, N. E., Hernández-Herrera, A., Martínez-Chávez, L., Rodríguez-García, M. O., Torres-Vitela, M. R., Mota de la Garza, L., y Castillo, A. (2003).

- Spread of bacterial pathogens during preparation of freshly squeezed orange juice. *Journal of Food Protection*, 66(8), 1490–4.
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., y López-Alonso, V. (2016). Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 7, 638.
- Martinon, A., Cronin, U. P., Quealy, J., Stapleton, A., y Wilkinson, M. G. (2012). Swab sample preparation and viable real-time PCR methodologies for the recovery of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes* from artificially contaminated food processing surfaces. *Food Control*, 24(1–2), 86–94.
- Mateus, T., Silva, J., Maia, R. L., y Teixeira, P. (2013). Listeriosis during pregnancy: a public health concern. *ISRN Bbstetrics and Gynecology*, 2013, 1–6.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., y Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 327–356.
- McCarthy, Y., Yang, L., Twomey, K. B., Sass, A., Tolker-Nielsen, T., Mahenthiralingam, E., ... Ryan, R. P. (2010). A sensor kinase recognizing the cell-cell signal BDSF (cis-2-dodecenoic acid) regulates virulence in *Burkholderia cenocepacia*. *Molecular Microbiology*, 77(5), 1220–1236.
- Mead, P. S., Finelli, L., Lambert-Fair, M. A., Champ, D., Townes, J., Hutwagner, L., ... Mintz, E. (1997). Risk factors for sporadic infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Archives of Internal Medicine*, 157(2), 204–208.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., Mccaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., ... Control, D. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 607–625.
- Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E., y Simões, M. (2016). The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Research International*, 86, 140–146.
- Mettler, E., y Carpentier, B. (1997). Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in Food Industry Premises. *Journal of Food Protection*, 61(1), 57–65.
- Meylheuc, T., Giovannacci, I., Briandet, R., y Bellon-fontaine, L. L. E. (2002). Comparison of the cell surface properties and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 65(5), 786–793.
- Midelet, G., y Carpentier, B. (2002). Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 4015–4024.
- Miettinen, H., Aarnisalo, K., Salo, S., y Sjoberg, A. M. (2001). Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. *Journal of Food Protection*, 64(5), 635–639.
- Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., O'Bryan, C., Crandall, P. G., ... Ricke, S. C. (2012). A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), 712–725.
- Miller, M. B., y Bassler, B. L. (2001). *Quorum sensing* in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165–199.
- Molobela, I. P., Cloete, T. E., y Beukes, M. (2010). Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(14), 1515–1524.

- Moltz, A. G., y Martin, S. E. (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*, 68(1), 92–97.
- Monk, I. R., Cook, G. M., Monk, B. C., Philip, J., y Bremer, P. J. (2004). Morphotypic conversion in *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Biological significance of rough colony isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6686–6694.
- Montañez-Izquierdo, V. (2013). Métodos convencionales, rápidos y alternativos para el control microbiológico de la higiene en superficies. [Tesis Doctoral]. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Montañez-Izquierdo, V. Y., Ríos-Castillo, A. G., Fontecha-Umaña, F., y Rodríguez-Jerez, J. J. (2012). Uso de sensores de superficie y métodos rápidos para controlar la contaminación ambiental en las industrias alimentarias: hacia el control on line. *MRAMA*.
- Moore, G., y Griffith, C. (2002). Factors Influencing recovery of microorganisms from surfaces by use of traditional hygiene swabbing. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 22(6), 410–421.
- Moreira, J. M. R., Fulgêncio, R., Alves, P., Machado, I., Bialuch, I., Melo, L. F., ... Mergulhão, F. J. (2016). Evaluation of SICAN performance for biofouling mitigation in the food industry. *Food Control*, 62, 201–207.
- Møretrø, T., y Langsrud, S. (2017). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022–1041.
- Morgan, D., Newman, C. P., Hutchinson, D. N., Walker, A. M., Rowe, B., y Majid, F. (1993). Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect.*, 111, 181–187.
- Mosquera-Fernández, M., Rodríguez-López, P., Cabo, M. L., y Balsa-Canto, E. (2014). Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 182, 26–36.
- Mostert, M. A., Hola, J., y Lelieveld, H. L. (2005). Handbook of food hygiene. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC*. Cambridge, Reino Unido.
- Mritunjay, S. K., y Kumar, V. (2015). Fresh farm produce as a source of pathogens: A review. *Research Journal of Environmental Toxicology*. 9(2), 59–70
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., y Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., y Foster, K. R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 206–224.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Kino, Y., Yamamoto, N., Kamei, S., Mori, H., ... Nakashima, N. (2016). Establishment of a multi-species biofilm model and metatranscriptomic analysis of biofilm and planktonic cell communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7263–7279.
- Neira-Arenas, G., y Cañas, L. (2007). Procedure to measure contact angles in fine divided solids. *Scientia et Technica*, 36, 833–838.
- Nemati, M., Hamidi, A., Dizaj, S. M., Javaherzadeh, V., y Lotfipour, F. (2016). An overview on novel microbial determination methods in pharmaceutical and food quality control. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(3), 301–308.
- Neset, T. S., y Cordell, D. (2012). Global phosphorus scarcity : identifying synergies for a sustainable future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2–6.
- Nguyen, U. T., y Burrows, L. L. (2014). DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms.

- International Journal of Food Microbiology*, 187, 26–32.
- Nho, S. W., Abdelhamed, H., Reddy, S., Karsi, A., y Lawrence, M. L. (2015). Identification of high-risk *Listeria monocytogenes* serotypes in lineage I (serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 845–852.
- Nickzad, A., y Déziel, E. (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? *Letters in Applied Microbiology*, 58(5), 447–453.
- Nightingale, K. K., Nightingale, K. K., Windham, K., Windham, K., Martin, K. E., Martin, K. E., ... Wiedmann, M. (2005). Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial c. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8764–8772.
- Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., ... Wiedmann, M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4458–4467.
- Nilsson, R. E., Ross, T., y Bowman, J. P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 14–24.
- Nocker, A., Cheung, C. Y., y Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 310–320.
- Norwood, D. E., y Gilmour, A. (1999). Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 576–582.
- Norwood, D. E., y Gilmour, A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 512–520.
- Norwood, D. E., y Gilmour, A. (2001). The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*, 33(4), 320–324.
- Nouha, K., Kumar, R. S., Balasubramanian, S., y Tyagi, R. D. (2017). Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. *Journal of Environmental Sciences*, 66, 225–245.
- Nutman, A. P., Bennett, V. C., Friend, C. R. L., Van Kranendonk, M. J., y Chivas, A. R. (2016). Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature*, 537(7621), 535–538.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., y Pognan, F. (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426.
- Oh, H. S., Tan, C. H., Low, J. H., Rzechowicz, M., Siddiqui, M. F., Winters, H., ... Rice, S. A. (2017). *Quorum quenching* bacteria can be used to inhibit the biofouling of reverse osmosis membranes. *Water Research*, 112, 29–37.
- Okshevsky, M., Regina, V. R., y Meyer, R. L. (2015). Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 73–80.
- Olsen, S. J., Patrick, M., Hunter, S. B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W. R., ... Mead, P. (2005). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *Clinical Infectious Diseases*, 40(7), 962–967.

- Orgaz, B., Lobete, M. M., Puga, C. H., y Jose, C. S. (2011). Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 817–828.
- Orihuel-Iranzo, E. J., Bertó-Navarro, R., Canet-Gascó, J. J., y Lorenzo-Cartón, F. (2012). El control de *Listeria monocytogenes* persistente en industrias alimentarias. *Alimentación, Equipos y Tecnologías*, 1, 40–43.
- Orihuel, E., Bertó, R., Lorenzo, F., López, C., San Jose, C., y Orgaz, B. (2014). Composición marcadora de biofilms y método de detección de los mismos en superficies. ES2397333A1 [Patente]. España.
- Orsi, R. H., Bakker, H. C. de., y Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2), 79–96.
- Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P., y Martínez-Suárez, J. V. (2016). The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: Evidence from comparative genome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), 308–317.
- Ortiz, S., López, V., y Martínez-Suárez, J. V. (2014a). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride-resistant strains. *Food Microbiology*, 39, 81–88.
- Ortiz, S., López, V., y Martínez-Suárez, J. V. (2014b). The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 106–112.
- Ortiz, S., López, V., Villatoro, D., López, P., Dávila, J. C., y Martínez-Suárez, J. V. (2010). A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(10), 1177–1184.
- Osimani, A., Garofalo, C., Clementi, F., Tavoletti, S., y Aquilanti, L. (2014). Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(10), 10824–10837.
- Owen, M., Willis, C., y Lamph, D. (2010). Evaluation of the TEMPO<sup>®</sup> most probable number technique for the enumeration of Enterobacteriaceae in food and dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1810–1816.
- Pan, Y., Breidt, F., y Gorski, L. (2010). Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1433–1441.
- Panisello, P. J., Rooney, R., Quantick, P. C., y Stanwell-smith, R. (2000). Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *Food Microbiology*, 59, 221–234.
- Percival, S. L., Knottenbelt, D. C., y Cochrane, C. A. (2011). Biofilms and veterinary medicine. En Springer series on biofilms. *Springer International Publishing*. Basel, Switzerland.
- Persat, A., Nadell, C. D., Kim, M. K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., ... Stone, H. A. (2015). The mechanical world of bacteria. *Cell*, 161(5), 988–997.
- Peterson, C. P., Sauer, C., y Chatfield, C. H. (2018). The extracellular polymeric substances of *Legionella pneumophila* biofilms contain amyloid structures. *Current Microbiology*, 75(6), 1–9.
- Petty, H. R. (2007). Fluorescence microscopy: Established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microscopy Research and*

- Technique*, 70, 687–709.
- Phillips, C. A. (2016). Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(8), 1731–1743.
- Piercey, M. J., Hingston, P. A., y Truelstrup Hansen, L. (2016). Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 63–74.
- Pirie, J. H. (1940). The Genus *Listerella* Pirie. *Science*, 91(2364), 383.
- Pitts, B., Hamilton, M. A., Zelver, N., y Stewart, P. S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 54(2), 269–276.
- Popowska, M., Krawczyk-Balska, A., Ostrowski, R., y Desvaux, M. (2017). InlL from *Listeria monocytogenes* is involved in biofilm formation and adhesion to mucin. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–11.
- Possas, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., y Valero, A. (2017). Models of microbial cross-contamination dynamics. *Current Opinion in Food Science*, 14, 43–49.
- Pottathil, M., Jung, A., y Lazazzera, B. A. (2008). CSF, a species-specific extracellular signaling peptide for communication among strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 4095–4099.
- Poulsen, L. V. (1999). Review: Article microbial biofilm in food processing. *LWT*, 32, 321–326.
- Pratten, J., Foster, S. J., Chan, P. F., Wilson, M., y Nair, S. P. (2001). *Staphylococcus aureus* accessory regulators: Expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes and Infection*, 3(8), 633–637.
- Raffaella, C., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., y Baffone, W. (2017). Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 132–140.
- Reij, M. W., y Den Aantrekker, E. D. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1), 1–11.
- Reis-Teixeira, F. B. dos, Alves, V. F., y de Martinis, E. C. P. (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 587–591.
- Ren, Y., Wang, C., Chen, Z., Allan, E., van der Mei, H. C., y Busscher, H. J. (2018). Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. *FEMS Microbiology Reviews*, (January), 1–14.
- Renzo, L. Di, Colica, C., Carraro, A., Goga, B. C., Marsella, L. T., Botta, R., ... Lorenzo, A. De. (2015). Food safety and nutritional quality for the prevention of non communicable diseases: the Nutrient, hazard Analysis and Critical Control Point process (NACCP). *Journal of Translational Medicine*, 13(128), 1–13.
- Ríos-Castillo, A. G., González-Rivas, F., y Rodríguez-Jerez, J. J. (2017). Bactericidal Efficacy of hydrogen peroxide-based disinfectants against gram-positive and gram-negative bacteria on stainless steel surfaces. *Journal of Food Science*, 82(10), 2351–2356.
- Ripolles-Avila, C., Ríos-Castillo, A. G., y Rodríguez-Jerez, J. J. (2018). Development of a peroxide biodetector for a direct detection of biofilms produced by catalase-positive bacteria on food-contact surfaces. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 506–515.
- Rivera-Betancourt, M., Shackelford, S. D., Arthur, T. M., Westmoreland, K. E., Bellinger, G., Rossman, M., ... Koohmaraie, M. (2004). Prevalence of *Escherichia*

- coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, 67(2), 295–302.
- Roberts, J. A. (2000). Economic aspects of food-borne outbreaks and their control. *British Medical Bulletin*, 56(1), 133–141.
- Rocourt, J., Moy, G., Vierk, K., y Schlundt, J. (2003). The present state of foodborne disease in OECD countries. WHO. Geneva, Switzerland.
- Røder, H. L., Raghupathi, P. K., Herschend, J., Brejnrod, A., Knøchel, S., Sørensen, S. J., y Burmølle, M. (2015). Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiology*, 51, 18–24.
- Rodríguez-López, P., Carballo-Justo, A., Draper, L. A., y Cabo, M. L. (2017). Removal of *Listeria monocytogenes* dual-species biofilms using combined enzyme-benzalkonium chloride treatments. *Biofouling*, 33(1), 45–58.
- Rodríguez-López, P., Puga, C. H., Orgaz, B., y Cabo, M. L. (2017). Quantifying the combined effects of pronase and benzalkonium chloride in removing late-stage *Listeria monocytogenes*–*Escherichia coli* dual-species biofilms. *Biofouling*, 33(8), 690–702.
- Rodríguez, A., y McLandsborough, L. A. (2007). Evaluation of the transfer of *Listeria monocytogenes* from stainless steel and high-density polyethylene to Bologna and American cheese. *Journal of Food Protection*, 70(3), 600–6.
- Rückerl, I., Muhterem-uyar, M., Muri-klinger, S., Wagner, K., Wagner, M., y Stessl, B. (2014). *Listeria monocytogenes* in a cheese processing facility: Learning from contamination scenarios over three years of sampling. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 98–105.
- Saá Ibusquiza, P., Herrera, J. J. R., y Cabo, M. L. (2011). Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 28(3), 418–425.
- Saad, M., See, T. P., Abdullah, M. F. F., y Nor, N. M. (2013). Use of rapid microbial kits for regular monitoring of food-contact surfaces towards hygiene practices. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 105, 273–283.
- Şahin, M., y Beytut, E. (2006). Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii* in the Kars region. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30(5), 503–506.
- Salas-Vázquez, D. I. (2007). Evaluación de metodologías de control higiénico de superficies alimentarias y adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógeno. [Tesis Doctoral]. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Sanchez-Vizueté, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., y Briandet, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 1–12.
- Sanchez, Z., Tani, A., y Kimbara, K. (2013). Extensive reduction of cell viability and enhanced matrix production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 flow biofilms treated with a D-amino acid mixture. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4), 1396–1399.
- Sattar, S. A., Springthorpe, S., Mani, S., Gallant, M., Nair, R. C., Scott, E., y Kain, J. (2001). Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: Development and application of a quantitative method using *Staphylococcus aureus* as a model. *Journal of Applied Microbiology*, 90(6), 962–970.
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4(6), 1–5.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M., Roy, S. L., ...

- Griffi, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7–15.
- Schaffner, D. W. (2004). Mathematical frameworks for modeling *Listeria* cross-contamination in food-processing plants. *Journal of Food Science*, 69(6), R155–R159.
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., ... Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis — evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*, 308(4), 203–206.
- Schmidt, R. H. (1997). Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations. *IFAS Extension, University of Florida*, 1–11.
- Seviour, T., Hansen, S. H., Yang, L., Yau, Y. H., Wang, V. B., Stenvang, M. R., ... Dueholm, M. S. (2015). Functional amyloids keep quorum-sensing molecules in check. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6457–6469.
- Sewell, A. M., Warburton, D. W., Boville, A., Daley, E. F., y Mullen, K. (2003). The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2), 123–129.
- Shu, M., Browngardt, C. M., Chen, Y. Y. M., y Burne, R. A. (2003). Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. *Infection and Immunity*, 71(12), 7188–7192.
- Sieuwerts, S., Bron, P. A., y Smid, E. J. (2018). Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 90(December), 201–206.
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., y Vieira, M. J. (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants. Evidence of resistance and recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 84(4 C), 338–345.
- Simões, M., Simões, L. C., y Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
- Sinde, E., y Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17(4), 439–447.
- Sindhu, R., Ammu, B., Binod, P., Deepthi, S. K., Ramachandran, K. B., Soccol, C. R., y Pandey, A. (2011). Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 783–794.
- Solano, C., Echeverz, M., y Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and *quorum sensing*. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 96–104.
- Somers, E. B., y Wong, A. C. (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2218–2229.
- Speranza, B., Monacis, N., Sinigaglia, M., y Corbo, M. (2016). Approaches to removal and killing of *Salmonella* spp. biofilms. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e12758.
- Sprague, G. F., y Winans, S. C. (2006). Eukaryotes learn how to count *QS* by yeast. *Genes and Development*, 20(541), 1045–1049.
- Srey, S., Jahid, I., y Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585.

- Stellato, G., Storia, A. La, Filippis, F. De, Borriello, G., Villani, F., y Ercolini, D. (2016). Overlap of spoilage microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(April), 4045–4054.
- Stepanovi, S., Vukovi, D., Hola, V., di Bonaventura, G., Djuki, S., Irkovi, I., y Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899.
- Stewart, P. S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J. G., Lewandowski, Z., Ochsner, U. A., y Hassett, D. J. (2000). Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 836–838.
- Stiefel, P., Mauerhofer, S., Schneider, J., Maniura-Weber, K., Rosenberg, U., y Ren, Q. (2016a). Enzymes enhance biofilm removal efficiency of cleaners. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6), 3647–3652.
- Stiefel, P., Rosenberg, U., Schneider, J., Mauerhofer, S., Maniura-Weber, K., y Ren, Q. (2016b). Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 4135–4145.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M., y Costerton, J. W. (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5608–5613.
- Strathmann, M., Wingender, J., y Flemming, H. C. (2002). Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, 50(3), 237–248.
- Surman, S. B., Walker, J. T., Goddard, D. T., Morton, L. H. G., Keevil, C. W., Weaver, W., ... Kurtz, J. (1996). Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 25(1), 57–70.
- Swaminathan, B., y Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236–1243.
- Tan, S. Y. E., Chew, S. C., Tan, S. Y. Y., Givskov, M., y Yang, L. (2014). Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 1–6.
- Taylor, R., Maryan, C., y Verran, J. (1998). Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 80(5), 592–597.
- Teh, K. H., Flint, S., y French, N. (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 118–124.
- Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R., y Vieira, M. J. (2005). Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*, 22(2–3), 247–251.
- Teufel, L., y Redl, B. (2006). Improved methods for the investigation of the interaction between textiles and microorganisms. *Lenzinger Berichte*, 85, 54–60.
- Tezel, U., y Pavlostathis, S. G. (2015). Quaternary ammonium disinfectants: Microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology*, 33(Mic), 296–304.
- Thallinger, B., Prasetyo, E. N., Nyanhongo, G. S., y Guebitz, G. M. (2013). Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms.

- Biotechnology Journal*, 8(1), 97–109.
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M., Christieans, S., y Rozand, C. (2005). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), 85–94.
- Thimothe, J., Nightingale, K. K., Gall, K., Scott, V. N., y Wiedmann, M. (2004). Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. *Journal of Food Protection*, 67(2), 328–41.
- Tirado, C., y Schmidt, K. (2001). WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: Preliminary results and trends across greater Europe. *Journal of Infection*, 43(1), 80–84.
- Todd, E. C. D., Greig, J. D., Bartleson, C. A., y Michaels, B. S. (2009). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 9. Washing and drying of hands to reduce microbial contamination. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1937–1955.
- Todd, E. C. D., Michaels, B. S., Greig, J. D., Smith, D., Holah, J., y Bartleson, C. A. (2010). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 7. Barriers to reduce contamination of food by workers. *Journal of Food Protection*, 73(8), 1552–1565.
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, 65(4), 709–725.
- Traoré, O., Springthorpe, V. S., y Sattar, S. A. (2002). A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *Journal of Applied Microbiology*, 92(3), 549–555.
- Troller, J. (1993). Cleaning and sanitizing. En sanitation in food processing (p. 458). *Academic Press*. Londres, Reido Unido.
- Udine, C., Brackman, G., Bazzini, S., Buroni, S., van Acker, H., Pasca, M. R., ... Coenye, T. (2013). Phenotypic and genotypic characterisation of *Burkholderia cenocepacia* J2315 mutants affected in homoserine lactone and diffusible signal factor-based quorum sensing systems suggests interplay between both types of systems. *PLoS ONE*, 8(1), 7–10.
- Uhl, J. R., Bell, C. A., Sloan, L. M., Espy, M. J., Smith, T. F., Rosenblatt, J. E., y Cockerill, F. R. (2002). Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for the detection of microbial pathogens: The Mayo-Roche Rapid Anthrax Test. *Mayo Clinic Proceedings*, 77(7), 673–680.
- UN. (2017). World population prospects. The 2017 revision. Nueva York, EE.UU.
- Unnevehr, L., y Roberts, T. (2002). Food safety incentives in a changing world food system. *Food Control*, 13, 73–76.
- Välimaa, A. L., Tilsala-Timisjärvi, A., y Virtanen, E. (2015). Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain - A review. *Food Control*, 55, 103–114.
- van der Veen, S., y Abee, T. (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 421–431.
- van Houdt, R., y Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1117–1131.
- Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S., y Sjöberg, A.-M. (1996). HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control*, 7(6), 263–276.
- Vasile, A. J., Andreea, I. R., Popescu, G. H., Elvira, N., y Marian, Z. (2016). Land Use Policy Implications of agricultural bioenergy crop production and prices in changing

- the land use paradigm — The case of Romania. *Land Use Policy*, 50, 399–407.
- Velge, P., y Roche, S. M. (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: A result of the evolution between saprophytism and virulence? *Future Microbiology*, 5(12), 1799–1821.
- Verran, J. (2002). Biofouling in food processing: Biofilm or biotransfer potential? *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C*, 80(4), 292–298.
- Visick, K. L., y Fuqua, C. (2005). Decoding microbial chatter: Cell-cell communication in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5507–5519.
- Vogel, B. F., Huss, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P., y Gram, L. (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* Contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2586–2595.
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D. N., Mafu, A. A., Jacques, M., y Harel, J. (2014). Life on the outside: Role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 5(JULY), 1–12.
- von Bodman, S. B., Willey, J. M., y Diggle, S. P. (2008). Cell-cell communication in bacteria: United we stand. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4377–4391.
- von Canstein, H., Kelly, S., Li, Y., y Wagner-Döbler, I. (2002). Species diversity improves the efficiency of mercury-reducing biofilms under changing environmental conditions. *Microbiology*, 68(6), 2829–2837.
- Vorst, K. L., Todd, E. C. D., y Ryser, E. T. (2006a). Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *Journal of Food Protection*, 69(3), 2939–2946.
- Vorst, K. L., Todd, E. C. D., y Ryser, E. T. (2006b). Transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of turkey breast, bologna, and salami with simulated kitchen knives. *Journal of Food Protection*, 69(3), 2939–2946.
- Wang, H., Wang, H., Xing, T., Wu, N., Xu, X., y Zhou, G. (2016). Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 298–304.
- Wang, W., Zhou, X., Suo, Y., Deng, X., Cheng, M., Shi, C., y Shi, X. (2017). Prevalence, serotype diversity, biofilm-forming ability and eradication of *Listeria monocytogenes* isolated from diverse foods in Shanghai, China. *Food Control*, 73, 1068–1073.
- Wanyenya, I., Muyanja, C., y Nasinyama, G. W. (2004). Kitchen practices used in handling broiler chickens and survival of *Campylobacter* spp . on cutting surfaces in Kampala, Uganda. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1957–1960.
- Waters, C. M., y Bassler, B. L. (2005). *Quorum sensing*: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346.
- Weber, D. J., y Rutala, W. A. (1997). Role of environmental contamination in the transmission of vancomycin-resistant enterococci. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18(5), 306–309.
- Welch, K., Cai, Y., y Strømme, M. (2012). A method for quantitative determination of biofilm viability. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(4), 418–431.
- Whitehead, K. A., Smith, L. A., y Verran, J. (2010). The detection and influence of food soils on microorganisms on stainless steel using scanning electron microscopy and epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 141(SUPPL.), S125–S133.
- WHO. (1992). Report of the panel on food and agriculture. Geneva, Switzerland.
- WHO. (2006). WHO consultation to develop a strategy to estimate the global burden of

- foodborne diseases. Geneva, Switzerland.
- WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Geneva, Switzerland.
- Whyte, P., Collins, J. D., McGill, K., Monahan, C., y O'Mahony, H. (2001). Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 64(3), 388–391.
- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L., y Batt, C. A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity*, 65(7), 2707–2716.
- Wilson, S., Hamilton, M. A., Hamilton, G. C., Schumann, M. R., y Stoodley, P. (2004). Statistical quantification of detachment rates and size distributions of cell clumps from wild-type (PAO1) and cell signaling mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5847–5852.
- Winkelströter, L. K., y de Martinis, E. C. P. (2015). Different methods to quantify *Listeria monocytogenes* biofilms cells showed different profile in their viability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 231–235.
- Witte, A. K., Bobal, M., David, R., Blättler, B., Schoder, D., y Rossmanith, P. (2017). Investigation of the potential of dry ice blasting for cleaning and disinfection in the food production environment. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 735–741.
- Wong, C. S., Koh, C. L., Sam, C. K., Chen, J. W., oon, Chong, Y. M. eng, Yin, W. F., y Chan, K. G. (2013). Degradation of bacterial *quorum sensing* signaling molecules by the microscopic yeast *Trichosporon loubieri* isolated from tropical wetland waters. *Sensors*, 13(10), 12943–12957.
- Wu, Y., y Outten, F. W. (2009). IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. *Journal of Bacteriology*, 191(4), 1248–1257.
- Xavier, K. B., y Bassler, B. L. (2003). LuxS *quorum sensing*: More than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 191–197.
- Yarwood, J. M., y Schlievert, P. M. (2003). *Quorum sensing* in *Staphylococcus* infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112(December), 1620–1625.
- Zameer, F., Gopal, S., Krohne, G., y Kreft, J. (2010). Development of a biofilm model for *Listeria monocytogenes* EGD-e. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 1143–1147.
- Zetzmann, M., Okshevsky, M., Endres, J., Sedlag, A., Caccia, N., Auchter, M., ... Riedel, C. U. (2015). DNase-sensitive and -resistant modes of biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–11.
- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., y Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 297–312.
- Zitz, U., Zunabovic, M., Domig, K. J., Wilrich, P.-T., y Kneifel, W. (2011). Reduced detectability of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 74(8), 1282–1287.
- Zobell, C. E. (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1), 39–56.
- Zoz, F., Grandvalet, C., Lang, E., Iaconelli, C., Gervais, P., Firmesse, O., ... Beney, L. (2017). *Listeria monocytogenes* ability to survive desiccation: Influence of serotype, origin, virulence, and genotype. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 82–89.



## **Anexo I**



A continuación, se enumeran las publicaciones generadas durante el transcurso de esta tesis doctoral.

### Artículos derivados de la tesis

Ripolles-Avila, C., Ríos-Castillo, A.G., Guerrero-Navarro, A.E., Rodríguez-Jerez, J.J. (2018). Reinterpretation of a classic method for the quantification of cell density within biofilms of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 6(2): 70–75.

Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Guerrero-Navarro, A.E., Rodríguez-Jerez, J.J. (2018). Establishment of incubation conditions to optimize the *in vitro* formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food Control*, 92: 240–248.

Ripolles-Avila, C., Cervantes-Huaman, B.H., Hascoët, A.S., Yuste-Puigvert, J., A.E., Rodríguez-Jerez, J.J. Quantification of mature *Listeria monocytogenes* biofilms: a comparison of different methods. – Enviado y pendiente de revisión por: *Food Control*.

Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Guerrero-Navarro, A.E., Rodríguez-Jerez, J.J. Evaluation of the microbiological contamination of surfaces through the implementation of the SCH sensors in an Iberian pig processing plant. An approach towards the problem of *Listeria monocytogenes*. En preparación.

Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Guerrero-Navarro, A.E., Rodríguez-Jerez, J.J. Removal of biofilms from food-contact surfaces formed by wild strains of *Listeria monocytogenes* isolated from an Iberian Pig Processing Plant. En preparación.

González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A.G., Rodríguez-Jerez, J.J. Biofilms in the spotlight. Detection, Quantification and Elimination at a Food Industry Level – Enviado y pendiente de la segunda revisión por: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

### **Artículos colaterales de la tesis**

Rodríguez-Jerez, J.J., Guerrero-Navarro, A.E., Ripolles-Avila, C. (2016). El desarrollo de nuevos alimentos. Un reto para el futuro de la alimentación. *SEBBM*, Dossier Científico 189.

Ripolles-Avila, C., Ríos-Castillo, A.G., Rodríguez-Jerez, J.J. (2018). Development of a peroxide biodetector for a direct detection of biofilms produced by catalase-positive bacteria on food-contact surfaces. *CyTA Journal of Food*, 16(1): 506–515.

Ripolles-Avila, C., Sewell, D.A., Martínez-García, M., Rodríguez-Jerez, J.J. Microbiota and allergic diseases. Searching potential connections – Enviado y pendiente de revisión por: *LWT Food Science and Technology*.

Ripolles-Avila, C., Ríos-Castillo, A.G., Fontecha-Umaña, F., Rodríguez-Jerez, J.J. Removal of *Salmonella* Typhimurium and *Cronobacter sakazakii* biofilms from food-contact surfaces through enzymatic cleaning. – Enviado y pendiente de revisión por: *Food Research International*.

### **Contribuciones a congresos**

Ripolles-Avila, C., Ríos-Castillo, A.G., Guerrero-Navarro, A.E., Rodríguez-Jerez, J.J. (2016). Quantification of the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes* on polystyrene by crystal violet assay. *30<sup>th</sup> EFFOST International Conference*, Vienna (Comunicación oral).

Ripolles-Avila, C., Hascoët A.S., Guerrero-Navarro, A.E., Martínez-García, M., Rodríguez-Jerez, J.J. (2017). Development of an *in vitro* model to form mature biofilms of *Listeria* spp. on food-contact surfaces. *31<sup>th</sup> EFFOST International Conference*, Sitges (Póster).

Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Guerrero-Navarro, A.E., Martínez-García, M., Rodríguez-Jerez, J.J. (2017). Effect of a conditioned protein film on *Listeria*

*monocytogenes* attachment and subsequent biofilm formation on polystyrene and stainless steel surfaces. 31<sup>th</sup> EFFOST International Conference, Sitges (Póster).

Ripolles-Avila, C., Guerrero-Navarro, A.E., Hascoët, A.S., Rodríguez-Jerez, J.J. (2018). *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* biofilm detachment from stainless steel surfaces through enzymatic technology. XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición, Barcelona (Póster).

Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Guerrero-Navarro, A.E., Martínez-García, M., Rodríguez-Jerez, J.J. (2018). Evaluation of the potential of an enzymatic product for the removal of biofilms from wild strains of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces. Food Micro Conference, Berlín (Póster) – Pendiente de presentación (septiembre).

**Patente** – Pendiente de publicación

Solicitante: Itram Higiene, S.L.

Inventores: Miquel Osset Hernández, Bruna Portet Danés, Carolina Ripollés Ávila, José Juan Rodríguez Jerez, Irene Ylla Monfort

Título: Composición detergente para el control y la eliminación de biofilms.

Código de referencia: EP17382924.3

