



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

“Trabajo presentado para la superación de los 15 créditos del Módulo Trabajo de Fin de Máster del **Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal**”

Desinfección en continuo mediante plasma frío de cintas transportadoras en la industria cárnica

Andrea G. Costa Almada

Julio-2017

Dra. Montserrat Mor-Mur Francesch

Profesora titular de Tecnología de los alimentos del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments (Facultat de Veterinària)* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*

INFORMA

Que el trabajo de investigación titulado: “Desinfección en continuo mediante plasma frío de cintas transportadoras en la industria cárnica” ha sido realizado bajo mi supervisión y tutela por Andrea G. Costa Almada dentro del módulo Trabajo de Fin de Máster del Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 5 de julio de 2017

Dra. Montserrat Mor-Mur Francesch

Agradecimientos

A Dios y a la Mater, mis guías y mi fortaleza.

A mis padres y hermanos, por el cariño, la contención y el apoyo incondicional de siempre.

A Geri, por todo el apoyo y aliento durante este proceso.

A Montserrat, por su tiempo, dedicación y por guiarme en la elaboración de este trabajo de investigación.

A Maria Ángeles, Xavi, Leo y todos los que integran el equipo de trabajo del laboratorio de microbiología por su predisposición y toda la ayuda que me brindaron.

A la empresa Iris Spain, por su importante colaboración en la realización de este trabajo.

A Becal, por la oportunidad de cumplir el sueño de seguir formándome como profesional en una universidad de prestigio como la UAB y contribuir a futuro con el fortalecimiento de mi país.

Índice

	Págs.
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Materiales y Métodos.....	5
2.1. Superficie de las cintas transportadoras e inóculos.....	5
2.2. Tratamiento con plasma frío.....	6
2.3. Preparación de microorganismos, contaminación de las superficies y recuperación de bacterias post-tratamiento.....	6
2.4. Análisis estadístico.....	8
3. Resultados y Discusión.....	9
3.1. Puesta a punto de la metodología.....	9
3.2. Recuentos de controles.....	10
3.3. Efecto del tratamiento con plasma frío.....	12
4. Conclusiones.....	20
5. Referencias bibliográficas.....	21

Resumen

En la industria alimentaria es muy posible la contaminación cruzada entre superficies de contacto (en las cuales pudieron quedar microorganismos) y los alimentos. En este estudio se evaluó el tratamiento con plasma frío aplicado a fragmentos de poliuretano (uno de los materiales de las cintas transportadoras de la industria cárnica), impregnados con *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*, y con diferentes concentraciones de grasa de origen animal (0%, 1%, 5% y 10%). Tras un tratamiento de 20 s se lograron reducciones de 1,50 a 2 log UFC/100 cm² para *Salmonella spp.* y de 1,50 log UFC/100 cm² en promedio para *L. monocytogenes*, sin diferencias aparentes entre las concentraciones de grasa, por lo cual la presencia de la misma en mayor o menor cantidad no influiría sobre la vulnerabilidad de las bacterias en estudio. Estos resultados sugieren la potencial actividad del plasma frío en la industria alimentaria.

Abstract

In the food industry it is very possible the cross contamination between contact surfaces (in which microorganisms may remain) and food. In this study the treatment with cold plasma applied to polyurethane fragments (one of the materials of the conveyor belts of the meat industry) impregnated with *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*, and with different concentrations of animal fat (0%, 1%, 5% and 10%) was evaluated. After a treatment of 20 s, reductions of 1,50 to 2 log CFU/100 cm² were achieved for *Salmonella spp.* and of 1,50 log CFU/100 cm² on average for *L. monocytogenes*, without apparent differences between the fat concentrations, therefore the presence of fat in higher or lower amount would not influence the vulnerability of the bacteria under study. These results suggest the potential activity of cold plasma in the food industry.

1. Introducción

Los altos estándares de los mercados nacional e internacional sumados a las exigencias de salud pública, requieren la constante optimización de la calidad e inocuidad de productos, desafiando a la industria cárnica a mejorar los sistemas de producción para reducir al mínimo los riesgos de contaminación de alimentos. Por ello la limpieza y la desinfección juegan un papel fundamental durante el procesamiento y la elaboración de alimentos. Una incorrecta ejecución de dichas tareas puede conllevar serias pérdidas económicas, y sobre todo constituir un peligro para la salud pública.

Numerosos estudios señalan que muchas bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos son capaces de adherirse a superficies de contacto con alimentos (Vogel et al., 2001), contaminando los mismos a medida que pasan por las superficies. Esto puede afectar seriamente la calidad y seguridad de los alimentos procesados, y representar un riesgo potencial para el consumidor (Bagge-Ravn et al., 2003). Cuando las bacterias se adhieren a las superficies y las colonizan muestran, por ejemplo, una menor susceptibilidad al desinfectante (Ronner y Wong, 1993; Sagripanti y Bonifacino, 2000). Además, la contaminación de superficies en el procesamiento de alimentos puede repercutir en la formación de biofilm (Corcoran et al., 2014), difícil de controlar o eliminar con métodos convencionales de limpieza (Smoot y Pierson, 1998; Chmielewski y Frank, 2003).

De las muchas superficies en contacto con los alimentos, las cintas transportadoras son de gran preocupación en el procesamiento porque durante la transferencia de productos alimenticios son a menudo contaminadas con un gran número de microorganismos incluyendo patógenos transmitidos por alimentos como *Listeria monocytogenes* (Thévenot et al., 2005) y *Salmonella spp.* (Veluz, Pitchiah y Alvarado, 2012). De hecho, muchos estudios han demostrado que *L. monocytogenes* es capaz de adherirse y formar biofilms en superficies en contacto con alimentos como polietileno, cloruro de polivinilo, vidrio y acero inoxidable (Blackman y Frank, 1996; Di Bonaventura et al., 2008). También se ha demostrado la capacidad de adhesión de *Salmonella spp.* en mayor y menor medida a superficies de poliuretano, polipropileno y acero inoxidable (Veluz, Pitchiah y Alvarado, 2012).

Numerosos serían los factores que facilitan la adherencia y supervivencia de dichas bacterias en las cintas transportadoras: la cepa bacteriana, la temperatura, el tiempo, la humedad, la disponibilidad de nutrientes, el pH, la presencia de inhibidores y el tipo de material que compone la superficie (Beumer y Hazeleger, 2003; Allan et al., 2004). Además,

otra cuestión importante relacionada con la desinfección de superficies es la adquisición de resistencia bacteriana a agentes desinfectantes (Rodrigues et al, 2011), desarrollada tras periodos prolongados de exposición. En adición, varios estudios señalan que la presencia de residuos alimenticios como leche y carne en superficies de acero inoxidable y otras, servirían de protección a varios patógenos entéricos (Helke y Wong, 1994; Kusumaningrum et al., 2003; Allan et al., 2004).

Considerando los factores mencionados previamente, es imprescindible que las industrias empleen estrictos protocolos de limpieza y desinfección. Normalmente éstos son aplicados diariamente al finalizar la producción, lo que en muchos casos puede ser insuficiente. Por ello hoy en día son evaluadas tecnologías emergentes como el plasma frío, en la búsqueda de mejorar los procesos de producción mediante una desinfección continua para la obtención de alimentos más seguros.

El plasma es materia energizada en estado gaseoso que puede ser generada por descarga eléctrica (Bogaerts et al., 2002). Se produce sometiendo un gas a un campo eléctrico (entre dos electrodos), ya sea de campo constante (de corriente continua) o de amplitud alterna (de alta frecuencia) (Thirumdas, Sarangapani y Annapure, 2015). Se distingue en dos grupos, el plasma de alta temperatura y el plasma frío, dependiendo del tipo de suministro de energía y la cantidad de energía transferida al plasma (Niemira, 2014a; Scholtz et al., 2015). El plasma frío se produce a través del campo eléctrico específico y de descarga silenciosa, a presión atmosférica o baja presión (Kylián et al., 2009; Misra et., al 2011). La aplicación de energía, en este caso eléctrica, genera un aumento de la energía cinética de los electrones que resulta en un gran número de colisiones en el gas que forma productos de plasma como electrones, iones, fotones, radicales y radiación de longitudes de onda variables, incluyendo la de los rangos UV (Thirumdas, Sarangapani y Annapure, 2015).

El plasma puede generarse utilizando diversos tipos de gases, de los cuales depende la eficacia del tratamiento. Se puede usar un gas simple tal como aire o nitrógeno, o el sistema puede depender de una mezcla de gases nobles, tales como helio, argón o neón (Pankaj et al., 2014). La eficiencia del gas en funcionamiento se mejora principalmente cuando se les añade oxígeno (Scholtz et al., 2015).

El tratamiento con plasma puede inactivar eficazmente una amplia gama de microorganismos incluyendo esporas (Kelly-Wintenberg et al., 1999; Feichtinger et al., 2003; Lee et al., 2006) y virus (Terrier et al., 2009). La tecnología de plasma frío es preferida como

recurso alternativo para esterilización en superficies y procesos de desinfección, ya que puede actuar tanto en células vegetativas como esporas en períodos más cortos de tiempo (Feichtinger et al., 2003). La aplicación potencial en la inactivación, se basa en el hecho de que las especies reactivas del plasma dañan el DNA de los microorganismos (Thirumdas, Sarangapani y Annapure, 2015). Además afectan significativamente los lípidos de la membrana debido a su ubicación a lo largo de la superficie de la célula bacteriana (Scholtz et al., 2015). Las proteínas son igualmente vulnerables a la acción de dichas especies, causando desnaturalización y fuga del contenido celular (Guo, Huang y Wang, 2015).

El plasma frío se ha aplicado con éxito para la esterilización superficial de material de envasado, además de su modificación funcional para conseguir las propiedades deseadas (Misra et al., 2015; Pankaj et al., 2015; Scholtz et al., 2015). En la actualidad se utiliza en el sector biomédico para la esterilización en frío de instrumentos y prótesis, así como de muchos materiales termolábiles utilizados en este sector (Soloshenko et al., 2000). Esta tecnología tiene varias aplicaciones potenciales para la industria alimentaria. Se estudia e investiga la desinfección de superficies de alimentos (como carnes, aves, productos lácteos, frutas y verduras recién cosechadas), así como granos, hierbas y semillas. Hasta el momento se desconoce la existencia de equipos en funcionamiento para desinfección de alimentos o superficies en el sector industrial.

El objetivo principal de este estudio es evaluar los efectos de 20 segundos de tratamiento con plasma frío como desinfectante sobre *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* presentes en la superficie de cintas transportadoras utilizadas en la industria cárnica, con distintas concentraciones de grasa de origen animal, simulando el estado real de las cintas durante el procesamiento industrial.

2. Materiales y Métodos

2.1. Superficie de las cintas transportadoras e inóculos

Porciones rectangulares de poliuretano (Esbelt, Vic, España) similares a las utilizadas en la industria cárnica, cortadas en dimensiones de 30x21 cm, fueron empleadas para el experimento con el plasma. Se utilizaron 5 cintas, una por cada concentración de grasa (0%, 1%, 5%, 10%) y una cinta control, que no se sometió a tratamiento con plasma. Cada una de las cintas fue dividida según se indica en la figura 1: en dos mitades; una mitad para inocular *Salmonella spp.* y la otra para *Listeria monocytogenes*. A su vez cada mitad fue dividida en 8 áreas de 38,06 cm² para obtener recuentos de 2 réplicas por cada bacteria (para *Salmonella spp.* S1 y S2 y para *L. monocytogenes* L1 y L2) a 2 tiempos: tiempo 0 (inmediatamente después de inocular) y a tiempo 3 (post-tratamiento). También como se observa en la fig. 1, quedaban áreas a partir de las cuáles se determinó la presencia o ausencia de bacterias en la cinta a tiempo 3, mediante un proceso de pre-enriquecimiento selectivo (“+/-”). Una vez realizado el ensayo, las cintas fueron limpiadas y desinfectadas con detergente y etanol al 70%. Se realizaron controles de limpieza durante la puesta a punto del ensayo.

Fig. 1 Esquema de la división de las cintas para el inoculado experimental.

	T0	T3	T0	T3
Réplica 1	S1-T0	S1-T3	L1-T0	L1-T3
		+/-		+/-
Réplica 2	S2-T0	S2-T3	L2-T0	L2-T3
		+/-		+/-
	<i>Salmonella spp.</i>		<i>L. monocytogenes</i>	

Microorganismos: *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* fueron proporcionados por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona, aislados en placas XLT4 ((Biokar Diagnostics, Francia) y Rapid L. Mono (Bio-Rad, España), respectivamente.

2.2. Tratamiento con plasma frío

El ensayo se llevó a cabo con un prototipo de plasma frío con sistema de descarga de barrera dieléctrica, diseñado y construido por la empresa Iris Spain (Castelldefels, Barcelona), hecho de metal de 124 x 124 x 42 cm, y compuesto por dos electrodos separados mediante dieléctricos de polipropileno con 2cm de espacio (gap) entre ellos. La muestra se situó sobre el electrodo inferior, por lo que la distancia de exposición fue de 1,98 cm aproximadamente. El máximo voltaje eléctrico del prototipo del plasma es de 80 Kv, y para el ensayo se utilizó 50 Kv. El prototipo opera a presión atmosférica y se utilizó aire ambiental como gas. Cada cinta fue tratada durante 20 s.

Fig. 2 Prototipo de plasma frío de descarga de barrera dieléctrica utilizado para el estudio.



2.3. Preparación de microorganismos, contaminación de las superficies y recuperación de bacterias post-tratamiento

Los microorganismos se recuperaron mediante el siguiente protocolo: a partir de las placas proporcionadas, se tomaron sendas colonias de *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes*, que fueron sembradas en placas con XLT4 (Biokar Diagnostics, Francia) y TSA (Oxoid, Reino Unido) respectivamente, e incubadas a 37°C durante 24 h, antes de ser utilizadas para inocular el medio de cultivo empleado en el ensayo. Se prepararon dos botes de vidrio (uno para cada bacteria) con medio de cultivo propio: 2g de extracto comercial de carne de

búfalo (Bovril, Gran Bretaña) y 3 g de agua de peptona deshidratada (Liofilchem, Italia) en 200 ml de agua destilada. Los botes se esterilizaron en autoclave a 120° C. Se inoculó una colonia de cada bacteria en los medios mencionados, y fueron incubados a 37°C durante 24 h. Se hicieron los recuentos correspondientes a cada día de preparación mediante banco de diluciones en Ringer (Sharlab, España): en promedio el recuento de *Salmonella spp.* fue de 7×10^7 UFC/ml y el de *L. monocytogenes* de 8×10^7 UFC/ml.

Se preparó una dilución de 0.3 g de tensioactivo Tween 80 (Applichem, Alemania) en 100 ml de agua destilada estéril. Se añadieron 20 ml de la dilución a 4 vasos estériles, que contenían 0, 0.4, 2 y 4 g de grasa (Tarrina de manteca de cerdo Salgot, España), obteniendo así 4 concentraciones de grasa diluida diferentes (0%, 2%, 10% y 20%).

Tras calentar las mezclas de grasa en baño María (40°C) para mejor homogenización y dejar enfriar hasta una temperatura que no dañe los microorganismos, se mezclaron en tubos de vidrio estériles separados para cada bacteria, 5 ml del cultivo y 5 ml de la solución de grasa correspondiente, obteniendo así 4 diluciones de cada microorganismo con grasa al 0%, 1%, 5% y 10%.

La impregnación de las cintas se hizo por deposición de 100 µl del cultivo microbiano con grasa y esparcido inmediatamente con asa de Digralsky en áreas de 76,12 cm². Previamente a este procedimiento, las mezclas fueron homogeneizadas con el vórtex (Velp Scientifica, España) una por una.

Una vez que las cintas fueron contaminadas correctamente, se procedió inmediatamente a tomar muestra de cada área (S1 y S2; L1 y L2) a tiempo 0 mediante un hisopo mojado con 100 µl de solución Ringer para cada muestra, y posteriormente se realizó siembra directa en placa con los medios correspondientes para cada bacteria (XLT4 para *Salmonella spp.* y TSA para *L. monocytogenes*). Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C durante 24 horas.

Las cintas fueron colocadas por separado en cajas de plástico y transportadas en vehículo por 45 min. aproximadamente a la empresa Iris Spain (Castelldefels, Barcelona), donde fueron sometidas individualmente al tratamiento del plasma por 20 segundos.

Posteriormente al tratamiento, ya en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Veterinaria, se tomó muestra de las áreas de las cintas correspondientes al tiempo 3 (S1 y

S2; L1 y L2) con hisopo, realizando siembra directa en placa con XLT4 y TSA, respectivamente.

Tras 24 h de incubación a 37° C se llevaron a cabo los recuentos. Para la cinta control se siguió el mismo método de toma de muestra y recuento.

Para *Salmonella spp.* se realizó pre-enriquecimiento selectivo a partir de las muestras obtenidas con hisopo de las áreas correspondientes, que fueron incubadas en vasos estériles con caldo lactosado: 5 g de tryptona, 5 g de lactosa y 3 g de extracto de carne (Condalab, España) en 1 L de agua destilada a 37°C durante 24 h. Posteriormente el cultivo fue puesto en Rappaport (Biokar Diagnostics, Francia) a 42°C por 24 h, y por último se realizó siembra directa en placa de XLT4. Para *L. monocytogenes*, las muestras fueron incubadas con medio de cultivo Fraser (Bio-Rad, España) a 37° C durante 24 h y se hizo siembra directa en placa Rapid L. Mono (Bio-Rad, España).

2.4. Análisis estadístico

Se llevaron a cabo 5 ensayos con 2 réplicas para cada bacteria por fragmento de cinta con las distintas concentraciones de grasa. Los datos y resultados fueron tratados estadísticamente mediante el programa Microsoft Office Excel, versión 2007.

3. Resultados y Discusión

En la actualidad existen diversos estudios sobre la utilización del plasma frío como herramienta en la desinfección de alimentos, ya sea aplicando la tecnología directamente sobre los mismos o en forma indirecta tratando los envases contenedores y empaquetados (Ziuzina et al., 2013; Min et al., 2016). También se ha estudiado su acción desinfectante sobre superficies diversas (láminas de vidrio, bandejas plásticas, hojas de aluminio), como modelo para la eliminación de microorganismos en la industria alimentaria (Yun et al., 2010; Niemira et al., 2014b). Sin embargo hasta hoy no se dispone de información suficiente acerca de la aplicación del plasma sobre superficies como las cintas transportadoras, que al momento del estudio presenten además de microorganismos inoculados, materia orgánica como grasa de origen animal, simulando lo que sería el estado real de las cintas transportadoras durante el procesamiento en planta.

3.1. Puesta a punto de la metodología

El presente estudio es continuación de un proyecto anterior llevado a cabo también en la Facultad de Veterinaria, en el cual se trabajó con cepas de microorganismos aisladas de cintas transportadoras de una sala de despiece (aerobios, lactobacilos, *Clostridium spp.*, *Listeria spp.*, mohos y levaduras). Las mismas fueron inoculadas y tratadas con plasma frío durante 20 y 120 s en continuo o a intervalos de 4 segundos (con 236 segundos de espera intermedia para simular lo que ocurriría en la empresa: 4 segundos de aplicación de plasma a cada vuelta de cinta y una vuelta cada 4 minutos). Los resultados principales en cuanto a *Salmonella spp.* y *Listeria spp.* que condujeron a establecer los objetivos del presente estudio fueron (Mor- Mur, comunicación personal pendiente de publicación):

- Tras 20 s de tratamiento, disminución variable de *Salmonella*: mayoría de las réplicas sin crecimiento en placa pero positivos al comprobar presencia/ausencia mediante las pruebas de pre-enriquecimiento, y algunas réplicas con reducciones de 2 log UFC/cm² (aproximadamente 70%).
- Disminución variable de *Listeria* tras 20 s de aplicación (50-70%).
- Inactivación completa de *Salmonella* en la mayoría de las réplicas tras 120 segundos e inactivación variable de *Listeria*;
- Resultados similares entre tratamientos continuos y por pulsos.

Al inicio del presente trabajo se emplearon los mismos métodos que en los ensayos anteriores, pero al añadir grasa a los cultivos se comprobó que la presencia de ésta dificulta la adhesión y sobre todo la homogenización del cultivo en las cintas, por ello durante la puesta a punto de este ensayo se realizaron varias pruebas hasta conseguir la distribución homogénea de los inóculos en la superficie y escoger el mejor método de recuperación de las bacterias en estudio, para la posterior realización de los recuentos;

- Se ensayaron diversas concentraciones de Tween 80 (0.1, 0.2 y 0.3 g en 100 ml de agua destilada) y se escogió la de 0.3, por ser la que proporcionaba mejor homogenización sin comprometer la viabilidad de las bacterias.
- Se utilizó en una primera prueba placas de Rodac, como en los ensayos previos mencionados, pero la grasa de las superficies de las cintas pasaba a las placas y dificultaba la obtención de recuentos fiables con este método, por lo cual se optó por el hisopo y siembra directa en placa.
- Se llevaron a cabo pruebas de control de la limpieza, en las que se comprobó tras los ensayos que no quedaban otros agentes contaminantes en las superficies de las cintas a ser utilizadas.

3.2. Recuentos de controles

Teniendo en cuenta que los microorganismos estudiados pueden conllevar a dificultades y variaciones en los recuentos transcurrido un tiempo desde la impregnación incluso en condiciones normales, y dado también que la presencia de grasa puede influir sobre esto, para todas las muestras en que se hizo el tratamiento de plasma se preparó la cinta denominada control (que no se sometió a tratamiento), y así obtener los recuentos de 3 horas después de la inoculación, aproximadamente el tiempo que demoraba el transporte y tratamiento de las demás cintas (Fig. 3 y 4).

Como se observa en la fig. 3 (pág. 11) se presentan reducciones de *Salmonella spp.* en los recuentos de los controles (para todas las concentraciones de grasa) con respecto a los recuentos del tiempo 0. Situándose éstos entre 3,42 y 3,68 log UFC/100 cm², se presentó una reducción de entre 0,57 y 0,67 log UFC/100 cm², sin variabilidad entre las distintas concentraciones de grasa.

En la fig. 4 (pág. 12) se observan las reducciones de *L. monocytogenes* en los recuentos de los controles en comparación con los del tiempo 0 (que van de 2,77 a 3,21 log

UFC/100 cm²), y que al igual que con *Salmonella spp.* se presentan para todas las concentraciones de grasa. Las reducciones estuvieron entre 0,07 y 0,76 log UFC/100 cm² para las concentraciones de 10% y 0% de grasa, respectivamente, pudiendo indicar que en el caso de *L. monocytogenes* a mayor concentración de grasa se conservan y/o recuperan una mayor cantidad de bacterias. Sin embargo aparentemente el caso del 5% de grasa es una excepción a esta tendencia, de modo que se recomienda la realización de más pruebas.

Las reducciones que se presentan en los controles para ambas bacterias con respecto a los recuentos del tiempo 0 (en el caso de *L. monocytogenes* presentan más variabilidad entre concentraciones de grasa) pueden deberse a una variación en la impregnación de las mismas a los diferentes recortes de cintas (por más que estén hechas del mismo material) en presencia de grasa por motivos meramente microbiológicos. En un estudio efectuado por Chowdhury et al. (2015) se demostró que la presencia de materia orgánica afectaba la impregnación de *Salmonella Typhimurium* a superficies sólidas.

Si bien se constató dicha dificultad en la recuperación de las bacterias de la superficie, son valores que no invalidan los resultados post-tratamiento, ya que tras ellos la disminución es mucho mayor (Fig. 5 y 6, pág. 14)

Fig. 3 Recuento de *Salmonella spp.* a tiempo 0 y a tiempo 3 en la cinta control (sin tratamiento).

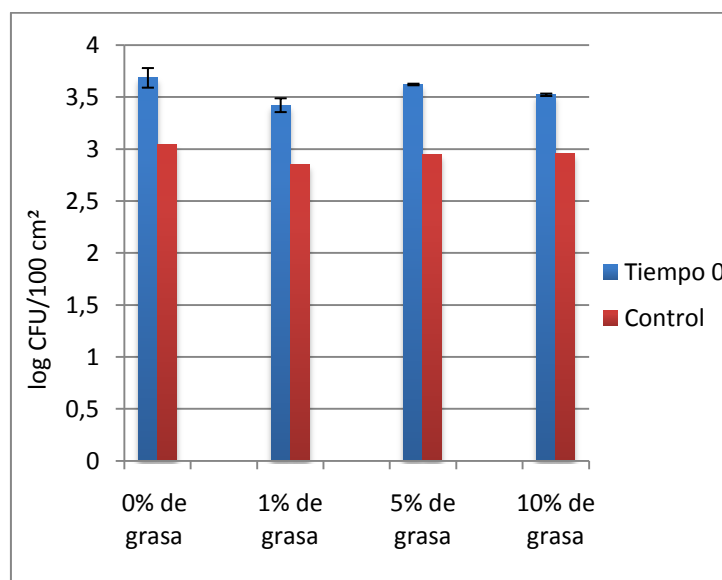
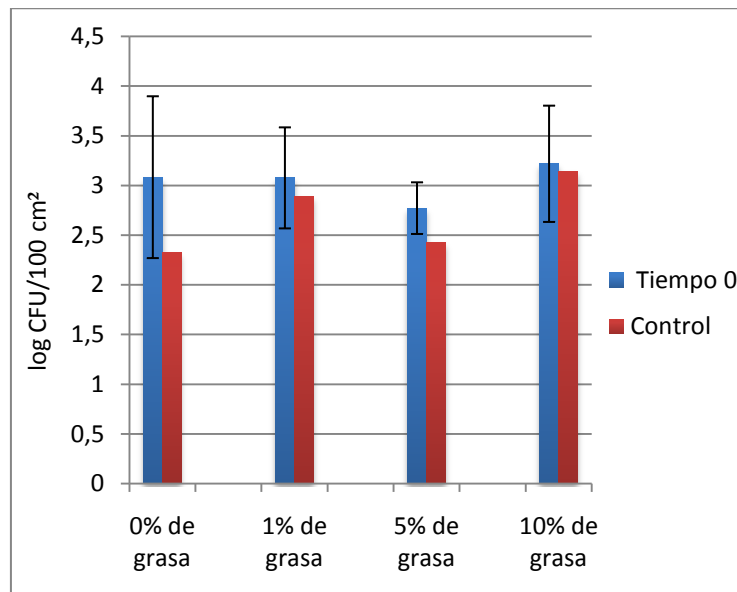


Fig. 4 Recuento de *L. monocytogenes* a tiempo 0 y a tiempo 3 en la cinta control (sin tratamiento).



3.3. Efecto del tratamiento con plasma frío

En el caso de *Salmonella spp.*, de los 5 ensayos realizados, en 4 no se obtuvo crecimiento en placa a tiempo 3 (post-tratamiento) independientemente a las distintas concentraciones de grasa. Como se comentó previamente, en el proyecto anterior también se observó la ausencia de colonias tras el tratamiento de 20 s, pero al hacer el pre-enriquecimiento selectivo se comprobó la presencia del microorganismo en las cintas. Es por ello que dicho procedimiento también se llevó a cabo en el presente estudio corroborando que efectivamente quedaban bacterias en las cintas, lo que supone que las mismas se encuentran dañadas y son difíciles de recuperar con hisopo y siembra directa para posterior recuento. Doyle y Mazzota (2000) demostraron que ciertos tipos de medios selectivos que contienen compuestos para inhibir especies que no son *Salmonella*, también pueden perjudicar la recuperación de *Salmonella* dañada sub-letalmente. Por ello, y teniendo en cuenta estos resultados, se sugiere la realización de más estudios para determinar la viabilidad y capacidad infectiva que presenta *Salmonella spp.* al estar dañada.

En la fig. 5 (pág. 14) se presentan los resultados del ensayo en el que sí se obtuvo crecimiento en placa tras el tratamiento desinfectante. Se observa que partiendo de un recuento aproximado de 3,5 log UFC/100 cm² para las distintas concentraciones de grasa, las reducciones de *Salmonella spp.* se situaron alrededor de 2 log UFC/100 cm² en promedio en el caso de 0%, 1% y 10% de grasa. Para la concentración de 5% de grasa, la reducción

después del tratamiento con plasma fue de 1,50 log UFC/100 cm². Considerando estos resultados, no se observan diferencias entre las reducciones obtenidas para las distintas concentraciones de grasa, y además no se presenta una tendencia que indique que la grasa tenga un efecto sobre la vulnerabilidad del microorganismo de acuerdo a su concentración, porque con 10% de grasa la reducción post-tratamiento fue igual a la obtenida con 1%. Al tratarse de resultados obtenidos de un solo ensayo, no fue posible la realización del estudio estadístico. Por lo tanto se deberían realizar otro tipo de pruebas para comprobar la disminución presentada en el caso del 5% de grasa. Se podría decir que el tratamiento con plasma frío en las condiciones dadas para este ensayo (20 s de tratamiento utilizando aire y 50 Kv) logró reducir entre 1,50 y 2 log UFC/100 cm² de *Salmonella spp.* sin clara dependencia de la cantidad de grasa.

En el caso de *L. monocytogenes*, en 4 de los 5 ensayos realizados se obtuvieron recuentos posteriores al tratamiento. En la fig. 6 (pág. 14) se observan las reducciones obtenidas; a tiempo 0 los recuentos variaron entre 2,77 y 3,21 log UFC/100 cm² y a tiempo 3 se situaron entre 1,23 y 1,97 log UFC/100 cm²; las reducciones obtenidas fueron 1.85, 1.57, 1.37 y 1.24 log UFC/100 cm² para 0% ,1% ,5% y 10% de grasa, respectivamente. Teniendo en cuenta estos resultados, y dada la variabilidad intra-muestra no hay diferencias aparentes entre los recuentos obtenidos post- tratamiento considerando las distintas concentraciones de grasa; sin embargo se observa una pequeña tendencia a menor efecto del plasma a medida que aumenta la concentración de grasa. Por ello se plantea la necesidad de llevar a cabo más experimentos para comprobar dicha tendencia. Por el momento se puede afirmar que el tratamiento con plasma frío en las condiciones dadas para el ensayo en el caso de *L. monocytogenes* logró reducir en promedio 1,50 log UFC/100 cm² sin diferencias importantes entre las concentraciones de grasa, por lo tanto la presencia de la misma en mayor o menor grado tampoco influiría en este caso sobre la vulnerabilidad de la bacteria al tratamiento con plasma frío.

Fig. 5 Reducciones de *Salmonella spp.* tras 20 s de aplicación de plasma y desviación estándar.

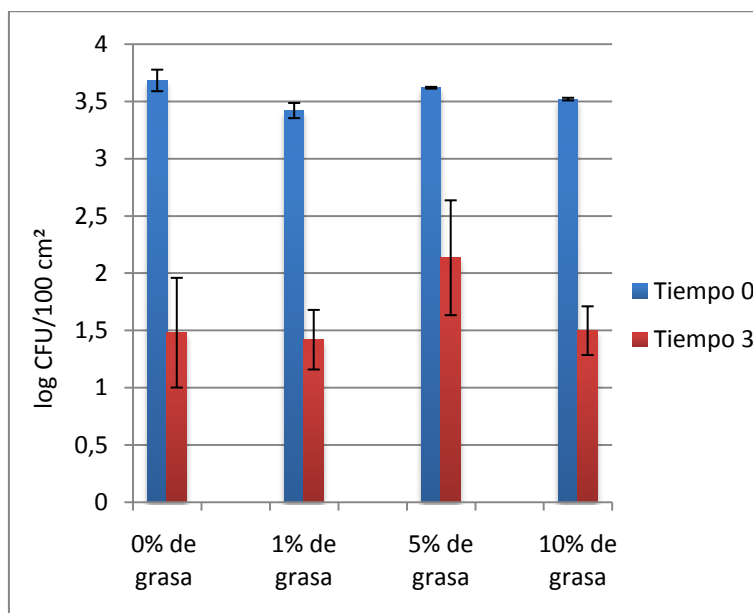
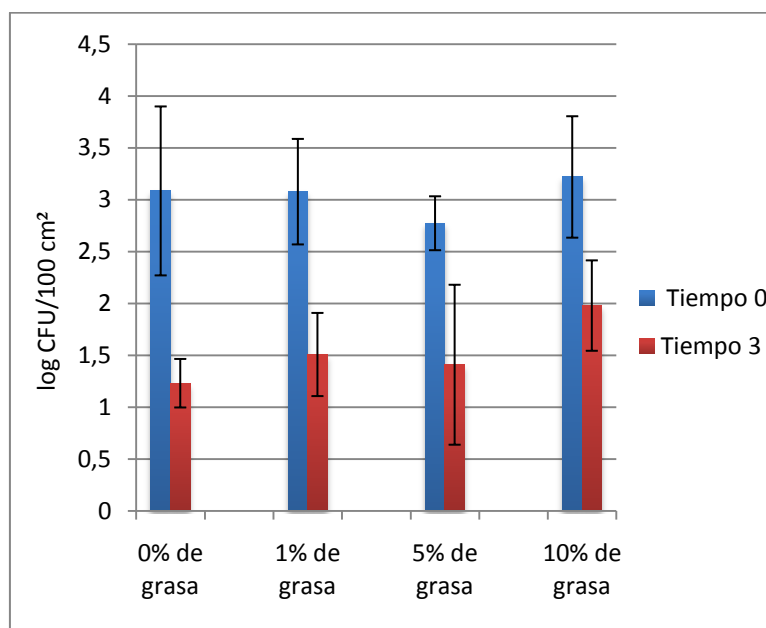


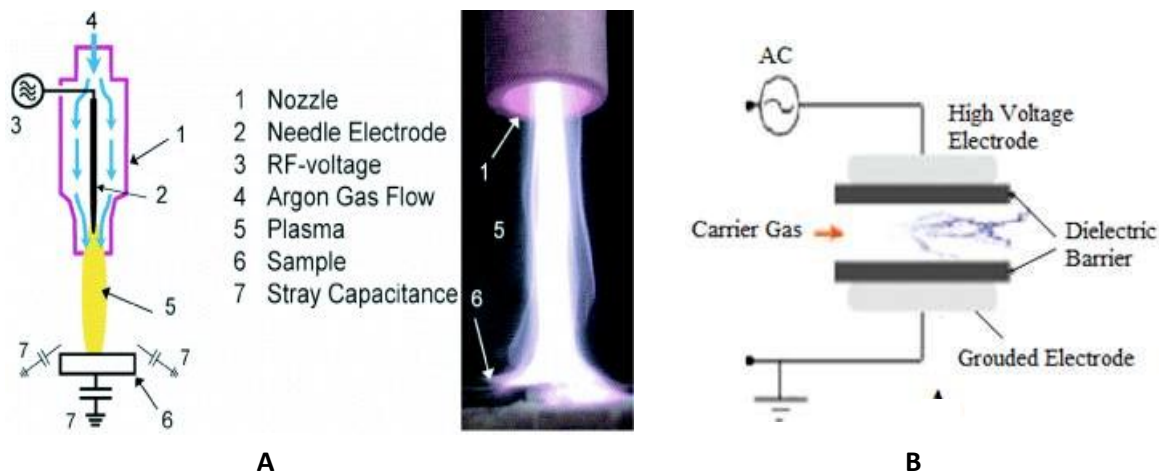
Fig. 6 Reducciones de *L. monocytogenes* tras 20 s de aplicación de plasma y desviación estándar.



El plasma frío empezó a ser considerado en los últimos años como una tecnología prometedora para la industria de procesamiento de alimentos. Diferentes sistemas de plasma frío varían en su configuración de electrodos, voltajes, composiciones de gases utilizados, conformaciones físicas y presiones. La amplia gama de aspectos técnicos de los mismos

dificulta las comparaciones (Niemira, 2012a). Sin embargo, las demostraciones de eficacia antimicrobiana utilizando estos variados sistemas sugieren aplicaciones potencialmente útiles de estas tecnologías (Niemira, Boyd y Sites, 2014b). Para comprender mejor las comparaciones entre trabajos, se explican a continuación brevemente las diferencias en cuanto a configuración que presentan modelos como el Plasma Jet en comparación al prototipo de plasma de barrera dieléctrica utilizado en este ensayo. Como se observa en la figura 7, el Plasma Jet permite una descarga de plasma más directa sobre la muestra a ser tratada (dependiendo de la distancia a la que se sitúe la misma), al utilizar el gas suministrado como un flujo de aire que ayuda a direccionar el plasma hacia la muestra, y siendo además el espacio de dispersión de las especies reactivas del plasma menor que en el caso de los sistemas de descarga de barrera dieléctrica. Existen además, entre los Plasma Jet variaciones en la disposición y número de electrodos, pudiendo presentar dos electrodos con 1cm de distancia entre ellos como en el modelo llamado “Gliding arc” o un solo electrodo como es el caso de los modelos de “aguja”.

Fig. 7 Modelo de Plasma Jet tipo aguja (A) <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/41/19/194008>; modelo de plasma de descarga de barrera dieléctrica similar al utilizado en este ensayo (B) https://www.researchgate.net/figure/257299570_fig2_Diagram-of-a-Dielectric-Barrier-Discharge-and-a-Floating-Electrode-Dielectric-Barrier (descargados en fecha 12 de junio de 2017)



Debido a que los recuentos se expresan en diferentes unidades de medida según la metodología de los distintos trabajos (por ejemplo: log UFC/ml, log UFC/g o log UFC/cm²),

la comparación cuantitativa entre los mismos es complicada, por lo que se presentarán a continuación comparaciones de tipo estimativo pero no exactas.

Algunos de los estudios que se plantean objetivos similares a este ensayo son los siguientes:

Utilizando el “Plasma Jet” sobre láminas de vidrio con biofilms de *Salmonella spp.* de diferente tiempo de maduración, Niemira, Boyd y Sites (2014b) lograron reducciones de 1.57, 1.82 y de 2.13 log UFC/ml en 5, 10 y 15 segundos de tratamiento, respectivamente, confirmando un aumento de la eficacia de tratamiento con el tiempo. Consideramos este estudio interesante por ser comparable a lo mencionado anteriormente sobre el tratamiento en continuo de 4 segundos. Para su investigación también utilizaron aire como gas y la distancia entre el emisor de plasma y las muestras era de 5 cm (en nuestro ensayo la reducción de *Salmonella spp.* fue de 1,50 y 2 log UFC/100 cm² en 20 s de tratamiento con una distancia de descarga de 2 cm aproximadamente, y como se mencionó previamente se presentan diferencias además por las configuraciones de modelos de plasma). También efectuaron el tratamiento a 7,5 cm de distancia y las reducciones logarítmicas fueron significativamente menores, demostrando la importancia de la distancia de descarga para el efecto bactericida, y por ende la necesidad de tener dicha variable en consideración para la elaboración de diseños industriales.

En otro estudio, se utilizó el plasma Jet sobre almendras inoculadas con *Salmonella* y se comparó el efecto del tratamiento con aire y con nitrógeno puro. Se lograron reducciones de hasta 1,16 log UFC/ml (Niemira, 2012b), consiguiendo con el uso de aire un efecto más letal sobre las bacterias. Estudios previos han demostrado que las especies reactivas al oxígeno mejoran la eficacia del plasma frío (Niemira, 2012b). Utilizando placas de agar inoculadas y un electrodo de aguja, Machala, Chládeková, Pelach (2010) establecieron que los radicales y las especies de oxígeno reactivo eran los agentes biocidas dominantes. En un estudio efectuado por Kim et al. (2011) en el que se trató con plasma frío durante 90 s tiras de bacon inoculadas con *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, se lograron mayores reducciones bacterianas al emplear una mezcla de helio con oxígeno (1,76 y 2,6 log UFC/g, respectivamente) que utilizando solamente helio para el tratamiento (aproximadamente 1 log UFC/g). Comparando este último estudio con nuestro ensayo, se observa que empleando la mezcla de helio con oxígeno la inactivación fue similar en el caso de *Salmonella* y mayor en *L. monocytogenes*, pero el tiempo de tratamiento fue bastante superior al nuestro (90 y 20 s,

respectivamente), por lo que se podría decir que el uso de aire es también más eficaz que la combinación de helio/oxígeno.

Además de todas las particularidades mencionadas anteriormente que diferencian los distintos tipos de plasma frío, y que ejercen un efecto sobre la inactivación de los microorganismos, la eficacia del tratamiento depende de una serie de factores que incluyen el género y la cepa de la bacteria en estudio, la carga microbiana, la capacidad y el mecanismo de adherencia de cada microorganismo a la superficie, las características inherentes de la superficie del alimento o material a ser tratado, la actividad del agua, el valor de pH y la composición del alimento (Fernández y Thompson, 2012; Ziuzina et al., 2013; Ziuzina et al., 2014).

El tratamiento de plasma frío con nitrógeno durante 2 min resultó en una reducción de 2,71 log UFC/ml de *S. Typhimurium* inoculada en filtros de membrana, mientras que un tratamiento de 15 min fue necesario para lograr reducciones de 2.72, 1.76 y 0.94 log UFC/ml en lechuga, fresa y patata, respectivamente. Por ello se indica que la diferente eficacia del tratamiento de plasma frío sobre la inactivación de *S. Typhimurium* en estos tipos de alimentos frescos es una consecuencia de sus características superficiales (Fernández, Noriega y Thompson, 2013). En el presente ensayo sobre una superficie inoculada relativamente lisa como son las cintas transportadoras, con 20 s de tratamiento y utilizando aire, la inactivación de *Salmonella spp.* fue de un máximo de 2 log UFC/100 cm², menos de un log de diferencia de la reducción obtenida en los filtros de membrana en 2 min; pudiendo deberse a las cepas bacterianas utilizadas y a los tipos de gases empleados (nitrógeno o aire en nuestro caso).

Ziuzina et al. (2014) llevaron a cabo un tratamiento con plasma frío por medio de descarga de barrera dieléctrica utilizando aire, al igual que en este ensayo. Emplearon un voltaje mayor (70 Kv) y la descarga de plasma fue indirecta (muestras a 140 mm de distancia de electrodos) sobre tomates cherry y fresas empaquetados en recipientes de polipropileno, que posteriormente al tratamiento fueron almacenados por 24 h. Lograron inactivar *Salmonella* en 6,3 log UFC/muestra y *L. monocytogenes* en 6,7 log UFC/muestra en tomates cherry en 10 y 120 segundos, respectivamente, mientras que a las mismas condiciones se requirió de 5 min de tratamiento para reducir la carga bacteriana en frutillas aproximadamente en 4 log UFC/muestra, demostrando que la inactivación microbiana por plasma frío depende de la bacteria y de las características estructurales del alimento o superficie que se está

tratando. En este caso, *L. monocytogenes* requirió de mayor tiempo de tratamiento que *Salmonella* para su inactivación en los tomates cherry. Se ha informado que las bacterias Gram positivas son más resistentes a los tratamientos con plasma frío a presión atmosférica que las Gram negativas (Montie, Kelly-Wintenberg y Roth, 2000; Lee et al., 2006; Ermolaeva et al., 2011; Frohling et al., 2012). La pared más gruesa de las bacterias Gram positivas puede constituir una barrera a la difusión de especies reactivas de plasma a través de ella, afectando así la eficacia antimicrobiana. Por el contrario, Fan et al. (2012) revelaron mayor sensibilidad de *Listeria innocua* que *Salmonella* y *E. coli* inoculada en superficie de tomate. En el presente ensayo la inactivación de *Salmonella spp.* fue aparentemente mayor que la de *L. monocytogenes* pero sin diferencias importantes, y además el número de réplicas fue insuficiente (en el caso de *Salmonella spp.*) para afirmar este punto categóricamente.

En cuanto a la mayor inactivación obtenida por Ziuzina et al. (2014) para ambas bacterias en comparación con el presente estudio, se debe resaltar que además del mayor voltaje utilizado en dicho ensayo, el hecho de que los alimentos tratados estén empaquetados incrementa la inactivación microbiana al generarse ozono dentro del recipiente y teniendo en cuenta que el ozono es la especie reactiva de mayor vida media y la más oxidante de todas las generadas (Ziuzina et al., 2013). Se ha demostrado que las reducciones considerables de bacterias tratadas en forma indirecta por plasma frío, se dan cuando se mantiene almacenamiento prolongado después del tratamiento, debido a la retención de las especies reactivas generadas dentro del contenedor cerrado, promoviendo así la difusión de éstas dentro del tejido del producto y afectando de este modo a las células microbianas (Ziuzina et al., 2013, Ziuzina et al., 2014).

Mediante el estudio efectuado por Song et. al (2009) también se comprobó que la efectividad del tratamiento de plasma frío a presión atmosférica depende de la energía suministrada tanto como del tiempo de tratamiento. Sobre porciones de queso y jamón inoculadas con cepas de *L. monocytogenes* lograron reducciones de 1,70 log a 5,82 log UFC/g para el queso y de 0,25 a 1,73 log UFC/g para el jamón, en 120 s variando la energía de 75 a 125 W respectivamente. En el presente estudio no hubo variación de voltaje, pero este punto debería considerarse en ensayos futuros para lograr mayor efectividad.

Teniendo en cuenta los resultados, se sugiere:

- Llevar a cabo más ensayos para aumentar el número de datos y afianzar los resultados obtenidos. En la actualidad existen pocos estudios publicados sobre el uso de plasma frío para la desinfección de superficies en general, por lo que se debería evaluar principalmente la aplicación sobre superficies de uso industrial.
- Analizar otros métodos que faciliten la impregnación de bacterias a las superficies de estudio, así como investigar otros procedimientos microbiológicos para optimizar la recuperación post-tratamiento de aquéllas.
- Evaluar los costes-beneficios de la utilización de plasma frío en cada empresa (inversión, mantenimiento, nivel de producción y beneficio por reducción de lotes contaminados y por ende de retornos, conservación de agua, entre otros).

Puesto que, en condiciones reales, una cinta transportadora sufriría repetidamente el efecto del plasma durante una jornada laboral, y además la concentración de bacterias contaminantes no sería tan elevada como la inoculada en este trabajo, es factible decir que el plasma frío constituye una herramienta con potencial para la desinfección en continuo de las cintas incluso en presencia de materia orgánica de origen animal, lo que supone una ventaja para la industria cárnica y la seguridad alimentaria.

4. Conclusiones

La presencia de grasa ejerce un efecto sobre la impregnación y persistencia de los microorganismos en las cintas que puede dificultar también la recuperación posterior de los mismos para la obtención de recuentos.

No se observan diferencias aparentes de los recuentos en función de la concentración de grasa tanto para *Salmonella spp.* como para *L. monocytogenes*.

El tratamiento de plasma frío de 20 segundos aplicado a superficies como las de las cintas transportadoras logra reducir el número de bacterias, pero la inactivación no es completa.

En el caso de *Salmonella spp.* aunque en la mayoría de los ensayos no se haya obtenido crecimiento en placa post-tratamiento, al efectuar el pre-enriquecimiento siempre se encontró la presencia del microorganismo, por lo tanto se provoca un importante daño celular pero no la inactivación total.

Con la salvedad de las diferencias en número de muestras para *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes*, aparentemente las reducciones de éste último son menores que las de *Salmonella spp.*

5. Referencias bibliográficas (UNE ISO 690-2013)

ALLAN, J. T., et al. Temperature and biological soil effects on the survival of selected foodborne pathogens on a mortar surface. *Journal of food protection*, 2004, vol. 67, no 12, p. 2661-2665.

BAGGE-RAVN, Dorthe, et al. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 87, no 3, p. 239-250.

BEUMER, Rijkelt R.; HAZELEGER, Wilma C. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. *Pathogens and Disease*, 2003, vol. 35, no 3, p. 191-197.

BLACKMAN, Isabel C.; FRANK, Joseph F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 1996, vol. 59, no 8, p. 827-831.

BOGAERTS, Annemie, et al. Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2002, vol. 57, no 4, p. 609-658.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2003, vol. 2, no 1, p. 22-32.

CHOWDHURY, Indranil, et al. Impact of growth phase and natural organic matter on the attachment kinetics of *Salmonella* Typhimurium to solid surfaces. *Environmental Engineering Science*, 2015, vol. 32, no 2, p. 111-120.

CORCORAN, M., et al. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and environmental microbiology*, 2014, vol. 80, no 4, p. 1507-1514.

DI BONAVENTURA, G., et al. 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*, 2008, vol. 104, no 6, p. 1552-1561.

DOYLE, M. Ellin; MAZZOTTA, Alejandro S. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. *Journal of Food Protection*, 2000, vol. 63, no 6, p. 779-795.

ERMOLAEVA, Svetlana A., et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *Journal of medical microbiology*, 2011, vol. 60, no 1, p. 75-83.

FAN, Xuetong, et al. Inactivation of *Listeria innocua*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157: H7 on surface and stem scar areas of tomatoes using in-package ozonation. *Journal of food protection*, 2012, vol. 75, no 9, p. 1611-1618.

FEICHTINGER, J., et al. Sterilisation with low-pressure microwave plasmas. *Surface and coatings technology*, 2003, vol. 174, p. 564-569.

FERNANDEZ, A.; THOMPSON, A. The inactivation of *Salmonella* by cold atmospheric plasma treatment. *Food Research International*, 2012, vol. 45, no 2, p. 678-684.

FERNANDEZ, Ana; NORIEGA, E.; THOMPSON, Arthur. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. *Food microbiology*, 2013, vol. 33, no 1, p. 24-29.

FRÖHLING, A., et al. Atmospheric pressure plasma treatment of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* at polysaccharide surfaces: Inactivation kinetics and flow cytometric characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2012, vol. 13, p. 142-150.

GUO, Jian; HUANG, Kang; WANG, Jianping. Bactericidal effect of various non-thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: A review. *Food Control*, 2015, vol. 50, p. 482-490.

HELKE, David M.; WONG, Amy CL. Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and Buna-N rubber. *Journal of Food Protection*, 1994, vol. 57, no 11, p. 963-968.

KELLY-WINTENBERG, K., et al. Use of a one atmosphere uniform glow discharge plasma to kill a broad spectrum of microorganisms. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 1999, vol. 17, no 4, p. 1539-1544.

KIM, Binna, et al. Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiology*, 2011, vol. 28, no 1, p. 9-13.

KUSUMANINGRUM, H. D., et al. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International journal of food microbiology*, 2003, vol. 85, no 3, p. 227-236.

KYLIÁN, Ondřej, et al. Removal of model proteins using beams of argon ions, oxygen atoms and molecules: mimicking the action of low-pressure Ar/O₂ ICP discharges. *Plasma Processes and Polymers*, 2009, vol. 6, no 4, p. 255-261.

LEE, Kyenam, et al. Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *The Journal of Microbiology*, 2006, vol. 44, no 3, p. 269-275.

MACHALA, Zdenko; CHLÁDEKOVÁ, Lenka; PELACH, Michal. Plasma agents in bio-decontamination by dc discharges in atmospheric air. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2010, vol. 43, no 22, p. 222001.

MIN, Sea C., et al. Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma inhibits *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and Tulane virus in Romaine lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, vol. 237, p. 114-120.

MISRA, N. N., et al. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews*, 2011, vol. 3, no 3-4, p. 159-170.

MISRA, N. N., et al. Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour. *Food Hydrocolloids*, 2015, vol. 44, p. 115-121.

MONTIE, Thomas C.; KELLY-WINTENBERG, Kimberly; ROTH, J. Reece. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Transactions on plasma science*, 2000, vol. 28, no 1, p. 41-50.

NIEMIRA, Brendan A. Cold plasma decontamination of foods. *Annual review of food science and technology*, 2012a, vol. 3, p. 125-142.

NIEMIRA, Brendan A. Cold plasma reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 on almonds using ambient pressure gases. *Journal of food science*, 2012b, vol. 77, no 3, p. M171-M175.

NIEMIRA, Brendan A. Decontamination of foods by cold plasma. *Emerging Technologies for Food Processing*, 2014a, ed. 2, book chapter 18, p. 327-333.

NIEMIRA, Brendan A.; BOYD, Glenn; SITES, Joseph. Cold plasma rapid decontamination of food contact surfaces contaminated with *Salmonella* biofilms. *Journal of food science*, 2014b, vol. 79, no 5, p. M917-M922.

PANKAJ, Shashi Kishor, et al. Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 2014, vol. 35, no 1, p. 5-17.

PANKAJ, Shashi Kishor, et al. Dielectric barrier discharge atmospheric air plasma treatment of high amylose corn starch films. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, vol. 63, no 2, p. 1076-1082.

RODRIGUES, Diana, et al. *Salmonella enterica* Enteritidis biofilm formation and viability on regular and triclosan-impregnated bench cover materials. *Journal of food protection*, 2011, vol. 74, no 1, p. 32-37.

RONNER, Amy B.; WONG, Amy CL. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and Buna-n rubber. *Journal of food Protection*, 1993, vol. 56, no 9, p. 750-758.

SAGRIPANTI, Jose-Luis; BONIFACINO, Aylin. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to liquid disinfectants on contaminated surfaces before formation of biofilms. *Journal of AOAC International*, 2000, vol. 83, no 6, p. 1415-1422.

SCHOLTZ, Vladimir, et al. Nonthermal plasma—a tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology advances*, 2015, vol. 33, no 6, p. 1108-1119.

SMOOT, L. Michele; PIERSON, Merle D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *Journal of food protection*, 1998, vol. 61, no 10, p. 1293-1298.

SOLOSHENKO, I. A., et al. Sterilization of medical products in low-pressure glow discharges. *Plasma physics reports*, 2000, vol. 26, no 9, p. 792-800.

SONG, Hyun Pa, et al. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 2009, vol. 26, no 4, p. 432-436.

THÉVENOT, D., et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, vol. 102, no 1, p. 85-94.

THIRUMDAS, Rohit; SARANGAPANI, Chaitanya; ANNAPURE, Uday S. Cold plasma: a novel non-thermal technology for food processing. *Food biophysics*, 2015, vol. 10, no 1, p. 1-11.

TERRIER, O., et al. Cold oxygen plasma technology efficiency against different airborne respiratory viruses. *Journal of Clinical Virology*, 2009, vol. 45, no 2, p. 119-124.

UNE ISO 690. 2013. Información y documentación: directrices para la elaboración de referencias bibliográficas y de citas de recursos de información. Traducida de la norma ISO 690:2010. Madrid: AENOR.

VELUZ, G. A.; PITCHIAH, S.; ALVARADO, C. Z. Attachment of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes* to stainless steel and plastic conveyor belts. *Poultry science*, 2012, vol. 91, no 8, p. 2004-2010.

VOGEL, Birte Fønnesbech, et al. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and environmental microbiology*, 2001, vol. 67, no 6, p. 2586-2595.

YUN, Hyejeong, et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* inoculated on disposable plastic tray, aluminum foil, and paper cup by atmospheric pressure plasma. *Food Control*, 2010, vol. 21, no 8, p. 1182-1186.

ZIUZINA, Dana, et al. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli* in liquid media inside a sealed package. *Journal of applied microbiology*, 2013, vol. 114, no 3, p. 778-787.

ZIUZINA, Dana, et al. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. *Food microbiology*, 2014, vol. 42, p. 109-116.