

**Efectividad de dos tratamientos de
limpieza y determinación de la
regeneración de biofilms de *Listeria
monocytogenes* en superficies limpias
y con suciedad**

Cristhian Armando Delgado Pañora



Facultat de Veterinària
Departament de Ciència Animal i dels Aliments



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**EFFECTIVIDAD DE DOS TRATAMIENTOS DE LIMPIEZA
Y DETERMINACIÓN DE LA REGENERACIÓN DE
BIOFILMS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN
SUPERFICIES LIMPIAS Y CON SUCIEDAD**

Cristhian Armando Delgado Pañora

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

Trabajo dirigido por:

Dra. Carolina Ripollés Ávila

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Barcelona, septiembre 2021

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Carolina Ripollés Ávila, Profesora Asociada del Área de Nutrición y Bromatología,
del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICAN,

Que el trabajo de investigación titulado: *“Efectividad de dos tratamientos de limpieza y determinación de la regeneración de biofilms de Listeria monocytogenes en superficies limpias y con suciedad”* ha sido realizado bajo nuestra dirección por **Cristhian Armando Delgado Pañora**, dentro del módulo “Trabajo Fin de Máster” del Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente en Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) a 1 de septiembre de 2021.

Índice

0. Lista de abreviaturas	1
1. Resumen/Abstract	2
2. Introducción	4
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.1.1. Brotes de listeriosis registrados	6
2.1.2. Mecanismos de supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> formación de biofilms	6
2.2. Suciedad en la industria alimentaria	10
2.3. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria.....	11
2.3.1. Métodos convencionales: alcalinos clorados	13
2.3.2. Métodos alternativos: Enzimático	14
2.4. Objetivos.....	16
3. Materiales y métodos.....	16
3.1. Superficies de estudio	16
3.2. Cepas bacterianas.....	16
3.3. Generación de una capa acondicionadora de suciedad en acero inoxidable.....	17
3.4. Preparación del inóculo y biofilm monoespecie	17
3.5. Tratamiento de limpieza y desinfección	18
3.5.1. Procedimiento de limpieza: convencional y alternativo.....	19
3.5.2. Tratamiento de supervivencia de biofilms monoespecie a procedimientos de limpieza	19
3.6. Cuantificación de biofilms mediante TEMPO... ..	19
3.7. Análisis estadístico	20
4. Resultados y discusión	20
4.1. Formación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> en superficies con suciedad y suciedad	20
4.1.1. Influencia de las cepas en la formación de biofilms	21
4.2. Eliminación de biofilms con diferentes tratamientos de limpieza	23
4.2.1. Evaluación de la efectividad de los diferentes tratamientos de limpieza.....	25
4.3. Supervivencia celular de <i>L. monocytogenes</i>	27
5. Conclusiones.....	30
6. Bibliografía.....	31

0. Lista de abreviaturas

AESAN: “Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

ANOVA: “Análisis de la Variancia”

CECT: “Colección Española de Cultivos Tipo”

EFSA: "European Food Safety Authority (Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria)”

EPS: “Sustancias Poliméricas Extracelulares”

P: “valor *p*”

T^aAmb: “Temperatura Ambiente”

TSA: “Agar de Soja y Triptona”

UFC: “Unidades Formadoras de Colonias” **ETA:**
“Enfermedad de Transmisión Alimentaria”**log:**

“Logaritmo en base 10”

µg: “Microgramo”

ml y µl: “Mililitro” y “Microlitro”

OMS / WHO: “Organización Mundial de la Salud”

TSYEB: “Tryptone Soy Yeast Extract Broth (Caldo con Triptona, Soja y Extracto de Levadura)”

QS: “*Quorum sensing*”

C.I.P: “cleaning in place”

C.O.P: “cleaning out of place”

1. Resumen

A lo largo del tiempo, se ha indicado que muchas de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) son causadas por la contaminación cruzada entre superficies industriales de entornos de procesamiento y los alimentos bajo producción. De entre todos los microorganismos que destacan por la contaminación cruzada es *L. monocytogenes* el patógeno que resulta un problema para garantizar la inocuidad de los alimentos.

En el presente estudio, se utilizaron cuatro cepas distintas de *L. monocytogenes* pertenecientes al serotipo 1/2a y 4b, para determinar su capacidad de formación de biofilms en superficies de acero inoxidable con una capa acondicionadora de suciedad, en este caso, caldo de pollo, simulando los posibles restos en una industria cárnica, y en condiciones limpias, que reflejan las condiciones después de la aplicación de un proceso de higienización.

Posteriormente, se evaluó la efectividad de dos tratamientos de limpieza, se aplicó un método convencional mediante el empleo de un producto químico, un alcalino clorado, compuesto habitualmente utilizado en la industria alimentaria, y paralelamente se empleó la combinación de un alcalino clorado (*i.e.*, método convencional) con el objetivo de eliminar la materia orgánica y destruir parte de la matriz producida por los biofilms y posteriormente, la aplicación de un enzimático (*i.e.*, método alternativo) con el objetivo de eliminar por completo la matriz del biofilms y disgregar toda la estructura para despegar las células de la superficie y por último, se evaluó la supervivencia a dichos tratamientos de limpieza, para visualizar la rápida respuesta que puede mostrar dicho microorganismo a distintos tratamientos. Los resultados fueron obtenidos por el método TEMPO.

Los resultados obtenidos a nivel de especie no mostraron diferencias significativas según las condiciones de estudio, pero sí que hubo diferencias significativas respecto a las distintas cepas de estudio. Para el caso de la efectividad de los distintos tratamientos de limpieza, ambos lograron reducir la carga de *L. monocytogenes* pero no erradicar el microorganismo por completo. Como era de esperarse, el tratamiento que mostró menos efectividad fue el tratamiento con alcalino clorado. No obstante, los resultados de supervivencia reflejaron que el microorganismo, indistintamente del tratamiento que se aplique anteriormente, tiene una elevada supervivencia tras 24h de la aplicación de la limpieza.

1. Abstract

Over time, it has been indicated that many foodborne illnesses (FBDs) are caused by cross-contamination between industrial surfaces in processing environments and the food under production. Among all the microorganisms that stand out for cross-contamination is *L. monocytogenes*, which is a problem for ensuring food safety.

In the present study, four different strains of *L. monocytogenes* belonging to serotypes 1/2a and 4b were used to determine their capacity to form biofilms on stainless steel surfaces with a conditioning layer of dirt, in this case, chicken broth, simulating the possible remains in a meat industry, and in clean conditions, which reflect the conditions after the application of a sanitization process.

Subsequently, the effectiveness of two cleaning treatments was evaluated: a conventional method was applied using a chemical product, a chlorinated alkaline, a compound commonly used in the food industry, and in parallel, the combination of a chlorinated alkaline (*i.e.*, conventional method) was used to eliminate organic matter and destroy part of the matrix produced by the biofilms, and subsequently, the application of an enzymatic (*i.e.*, alternative method) with the objective of eliminating organic matter and destroying part of the matrix produced by the biofilms, and subsequently, the application of an enzymatic (*i.e.*, alternative method) with the objective of eliminating organic matter and destroying part of the matrix produced by the biofilms,

Finally, the survival to these cleaning treatments was evaluated in order to visualize the rapid response that this microorganism can show to different treatments. The results were obtained by the TEMPO method. The results obtained at the species level did not show significant differences according to the study conditions, but there were significant differences with respect to the different study strains. In the case of the effectiveness of the different cleaning treatments, both succeeded in reducing the *L. monocytogenes* load but did not eradicate the microorganism completely. As expected, the treatment that showed the least effectiveness was the chlorinated alkaline treatment. However, the survival results showed that the microorganism, regardless of the treatment previously applied, had a high survival rate 24h after the cleaning application.

2. Introducción

A lo largo del tiempo, se ha indicado que muchas de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) son causadas por la contaminación cruzada entre superficies industriales de entornos de procesamiento y los alimentos bajo producción (Leonard et al., 2004; Carpentier y Cerf, 2011). Esto sucede, en la mayoría de los casos, debido a que en la superficie puede encontrarse la presencia de biofilms (Maciel et al., 2010). Los biofilms son estructuras microbianas complejas que se generan a modo de protección y presentan ciertas adaptaciones al medio que los rodea, son capaces de adherirse de forma estable sobre distintas superficies, gracias a la acción de su matriz extracelular de sustancias poliméricas (Wingender y Neu, 1999). Para constituirlos, los microorganismos se adhieren a una superficie de forma irreversible y forman una matriz extracelular compuesta de distintas sustancias poliméricas que estabilizan y protegen a la comunidad ante diferentes tipos de estrés (Colagiorgi et al., 2017). Por ello, estas estructuras permiten que las bacterias permanezcan en la industria alimentaria durante largos periodos de tiempo, lo que conlleva a que desarrollen diferentes mecanismos de resistencia, aumentando la probabilidad de contaminación cruzada de los alimentos (Wilks et al., 2006). Esta contaminación cruzada puede tener lugar directamente por contacto con objetos contaminados. Las bacterias patógenas pueden permanecer en las superficies de los equipos incluso después de un proceso de higienización, lo que aumenta los riesgos de transmisión de enfermedades si por contaminación cruzada un microorganismo patógeno llega al alimento (Silva y Teixeira, 2008). De entre todos los microorganismos que destacan por la contaminación cruzada es *L. monocytogenes* el patógeno que resulta un problema para garantizar la inocuidad de los alimentos (Lawrence y Gilmour, 1994; Chasseignaux et al., 2002; Hernay Marti, 2003; Gallagher, 2003). Desde un marco tecnológico, los biofilms también pueden ocasionar pérdidas económicas debido a que pueden producir una reducción del flujo de líquidos, reducción de la transmisión del calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de membranas y la corrosión de metales (Domínguez et al., 2017).

Por ello y con el objetivo de garantizar la inocuidad de los productos elaborados en las industrias alimentarias, como parte imprescindible dentro del sistema APPCC, se encuentran los programas de limpieza y desinfección (Ripolles-Avila, et al., 2018). En este caso, por lo que concierne a la presencia de biofilms y la repercusión derivada en materia de inocuidad, la limpieza y desinfección se convierte en un punto clave para el

control de estas estructuras dentro de la industria alimentaria. Entre las operaciones de limpieza y desinfección habituales en la industria alimentaria ha destacado el empleo de métodos convencionales como los productos a base de cloro, el peróxido de hidrogeno, el yodo, el ozono o el ácido peracético, aunque en los últimos años, han destacado su ineficacia en la eliminación de biofilms, ya que no penetran en la matriz de la estructura (Aarnisalo et al., 2007) y se ha detectado presencia a posterior de la higienización, provocando también erosión metálica de los equipos, maquinaria y superficies de procesamiento y generando residuos tóxicos al medioambiente (Byun et al., 2021).

Por todo ello, en los últimos años se ha potenciado la búsqueda de nuevas alternativas para el control de biofilms, como la utilización de detergentes enzimáticos (Ripolles-Avila et al., 2020), los bacteriófagos (Carlton et al., 2005; Fister et al., 2019), quitosano (Mejía et al., 2018) o como podría ser la combinación de dos métodos, convencional y alternativo, una propuesta con perspectiva futura que se ha sugerido en este presente trabajo tal y como se discutirá en posteriores secciones.

2.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria ampliamente distribuida en el medio, capaz de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en entornos de procesamiento de alimentos por su capacidad de formar biofilms (Costa et al., 2016). Además, es un microorganismo con la capacidad de crecer en una amplia variedad de condiciones ambientales, bajo temperatura de refrigeración (2°C – 4°C), altas concentraciones de cloruro de sodio, diferentes rangos de pH y en presencia de partículas en suspensión, lo cual hace que esté ampliamente distribuido en el medio agrario (suelos, materia fecal, aguas residuales) como en diferentes industrias de elaboración de alimentos (Farber y Peterkin, 1991)

Actualmente, se han identificado 13 serotipos distintos de *L. monocytogenes*, de los cuales, se ha destacado los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b por su implicación en el 98% de los casos humanos de listeriosis (Ripolles-Avila et al., 2018). Entre los serotipos citados, se ha demostrado que el serotipo 1/2a es el más prevalente en la industria alimentaria (Ortiz et al., 2010), mientras que el serotipo 4b es el más patogénico, estando relacionados con los brotes de listeriosis registrados a lo largo de las últimas décadas (Kadam et al., 2013).

2.1.1. Brotes de listeriosis

La importancia de este patógeno a nivel europeo se relaciona con el alto riesgo que presenta a nivel de salud pública. Esto es debido a la enfermedad causada por el consumo de alimentos contaminados por este patógeno, la listeriosis. Ésta es la única ETA que reporta una tendencia creciente de casos en la UE entre 2015-2019 según el informe presentado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) junto con el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC). En él se especificó que durante el año 2019 se confirmaron un total de 2.621 casos, con una tasa de mortalidad del 17,8% (EFSA-ECDC, 2021). Dicha enfermedad produce infecciones graves del torrente sanguíneo (*e.g.*, septicemia) o el cerebro (*e.g.*, meningitis o encefalitis), afectando mayoritariamente a grupos de riesgo, como ancianos, personas con inmunodepresión, recién nacidos o embarazadas (Lomonaco et al., 2015).

Se han registrado diversos brotes de listeriosis a lo largo del tiempo. Este patógeno se ha aislado en una amplia variedad de productos alimenticios como quesos, carne mechada, productos de la pesca (Rocourt et al., 2000), variedad de lácteos (Espinoza M. et al., 2004) e incluso en vegetales (Martino et al., 2008). El verano de 2019, en la región de Andalucía, se registró un brote de listeriosis asociado al consumo de carne mechada. Tras una serie de análisis a los pacientes positivos de listeriosis, se registró que la cepa implicada fue caracterizada como serotipo 4b (CCAES, 2019; Fernández, 2019).

Además, este último año, se retiraron diversos lotes de embutidos procedente de la comunidad de Cataluña, por la presencia de *L. monocytogenes* (AESAN, 2021), este hecho no ocasionó ningún caso de listeriosis, ya que su detección fue rápida. Por lo tanto, aunque el sistema de higienización ha mejorado a lo largo del tiempo, aún queda mucho camino por delante para la eliminación completa del patógeno.

2.1.2. Mecanismo de supervivencia de *L. monocytogenes*: formación de biofilms

Las células que conforman a los biofilms muestran una mayor resistencia a cualquier sustancia antimicrobiana que las células planctónicas (*i.e.*, células individuales) debido a la capacidad de algunas bacterias de generar una respuesta de defensa activa frente a los desinfectantes o la protección que confiere la matriz extracelular, haciendo consecuentemente, muy complicada su eliminación (Baumann y Martin, 2009; Lewis, 2001). Respecto a *L. monocytogenes*, este microorganismo tiene la capacidad de formar

biofilms en superficies industriales, como el poliestireno, el politetrafluoroetileno (PTFE) utilizado en las cintas transportadoras, el acero inoxidable empleado para la mayoría de los equipos en la industria alimentaria y el poliéster que suele utilizarse como sellador de suelos (Ripolles-Avila, et al., 2020; Mazaheri et al., 2021). Además, *L. monocytogenes* al ser un microorganismo ubicuo es capaz de contaminar una amplia variedad de alimentos y los biofilms formados sobre superficies alimentarias presentan una elevada resistencia a tratamientos de higienización y desinfectantes tradicionales, como es el caso del amonio cuaternario (Mustapha y Liewen, 1989; Møretre et al., 2017) y hipoclorito de sodio (Petridis et al., 2019). Por este motivo, este microorganismo sobrevive durante largos periodos de tiempo, una vez se introduce en una industria alimentaria. La adhesión del microorganismo es la primera etapa clave para la formación de biofilms, en este caso, las cepas de *L. monocytogenes* presentan gran facilidad para adherirse a superficies vivas e inertes y requieren solo un corto espacio de tiempo para la unión. La adhesión de microorganismos a superficies es un proceso complejo que depende de las características de la superficie del sustrato y del propio microorganismo, así como de factores ambientales como temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes y de la regulación genética que esos factores ejercen en las bacterias implicadas (Stoodley et al., 2002). Para iniciar la adhesión, utiliza flagelos, pilis y proteínas de membrana (Gonzalez Ribas, 2005). Los flagelos, permiten la movilidad de las células hasta el sitio específico de adhesión y los pili, proteínas de adhesión, cápsulas y carga de las superficies, facilitan el proceso de agregación y adhesión. En el proceso de adhesión inicial de las células, existe un estado reversible, es decir, que las células pueden ser retiradas del sustrato fácilmente con un simple lavado y está condicionada tanto por las propiedades del sustrato como las del fluido y de la superficie de la célula (**Figura 1**). La fase reversible involucra fuerzas físicas como las electrostáticas y estéricas, van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Garrett et al., 2008). Esta ha sido usada para describir la interacción neta entre la célula y la superficie plana como un balance entre dos factores aditivos. Las interacciones de van der Waals son de atracción y las interacciones de repulsión se dan por la superposición entre el sustrato y la célula (doble capa eléctrica) (Blaschek et al., 2007). La carga de la superficie es otro factor influyente y ampliamente estudiado. En un principio, según la teoría DLVO se consideró que al tener los microorganismos frecuentemente carga negativa en su superficie, al aproximarse a sustratos naturales cargados positivamente, las células serían razonablemente atraídas por fuerzas electrostáticas hacia ellos. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos

habitualmente probados se adhieren mejor a materiales hidrofóbicos que a hidrofílicos. En este aspecto juega un papel relevante en el acondicionamiento de la superficie. Las superficies expuestas a fluidos quedan frecuentemente cubiertas por una película de moléculas orgánicas o inorgánicas procedentes de dicho fluido, como proteínas de la leche, de la carne de cerdo o de ternera en entornos alimentarios e incluso de EPS producido por bacterias allí residentes con anterioridad. Estos compuestos, en definitiva, modifican las características químicas de la superficie, favoreciendo (Schlisselberg y Yaron, 2013) o empeorando la adhesión (Wiiman et al., 2007) y pudiendo servir como nutrientes a las células que se instalen en su proximidad. Si las fuerzas de repulsión son mayores que las de atracción, la bacteria se separa de la superficie, lo que podría ocurrir probablemente antes del acondicionamiento del sustrato (Garrett et al., 2008). En la segunda fase, un número de células adsorbidas, reversiblemente, permanecen inmovilizadas y se adsorben irreversiblemente por los apéndices físicos de la bacteria (flagelos, pili y fimbrias) que superan las fuerzas físicas repulsivas de la doble capa eléctrica. Además, el contacto de los apéndices estimula las reacciones químicas de oxidación e hidratación, permitiendo la formación de enlaces con la superficie (Kumar y Anand, 1998). Por lo anterior, se requiere un mayor esfuerzo para remover la bacteria por la formación de fibrillas poliméricas, las cuales forman un puente entre la célula bacteriana y el sustrato (Kumar y Anand, 1998), y habilitan la asociación irreversible con la superficie, pero son tan fuertes que impiden la remoción de estas colonias ya formadas. Por ello los medios para removerlas requieren tratamientos químicos fuertes, aplicación de enzimas, detergentes, sanitizantes, surfactantes y/o condiciones de calor extremas.

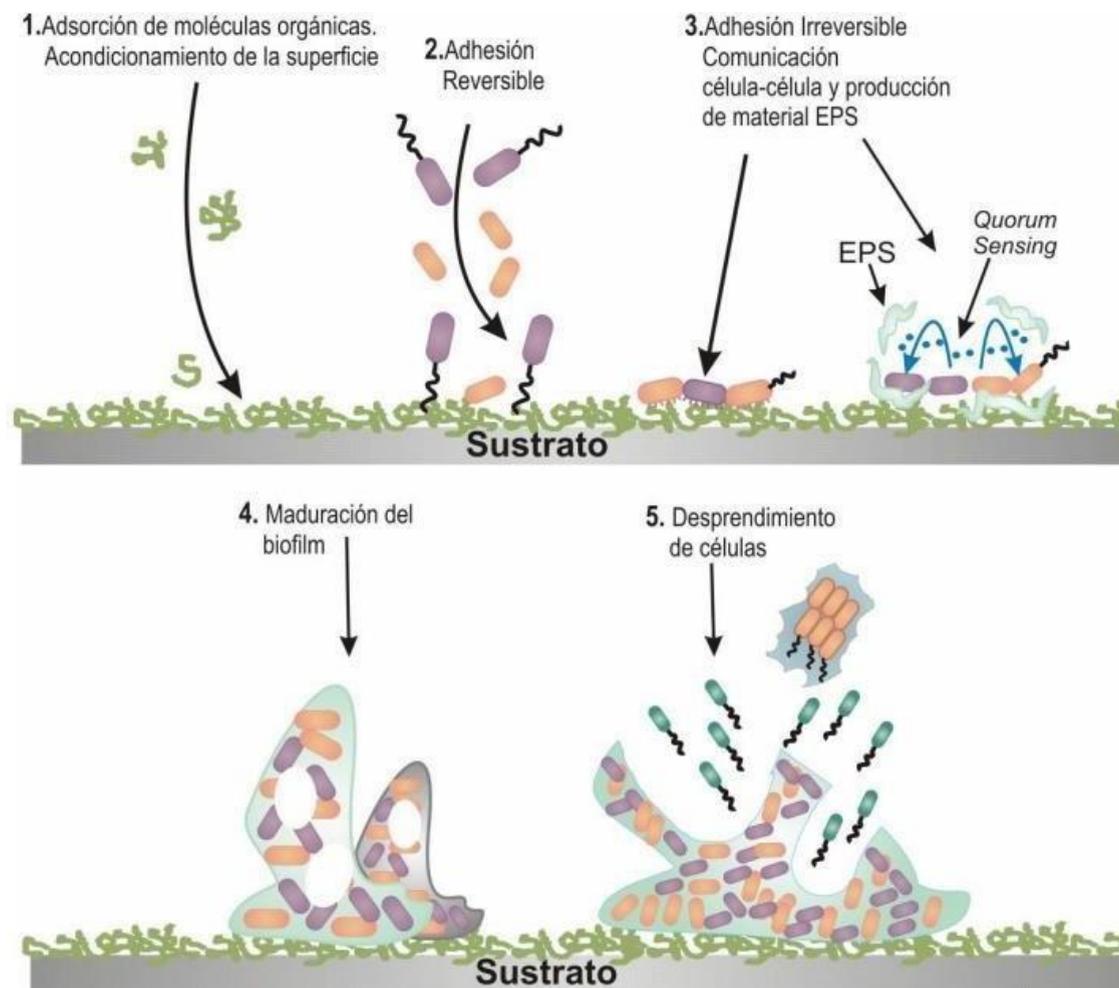


Figura 1: Esquema de las etapas presentes durante el desarrollo de un biofilm sobre un sustrato (*e.g.*, suciedad). Obtenido de (Salas, 2019).

Además, dicha matriz formada en la estructura actúa como una barrera que permite reducir de manera significativa la acción de los agentes antimicrobianos, protegiendo las células del interior del biofilm (Dygico et al., 2020). La influencia del sustrato sobre el número de bacterias en una industria alimentaria ha mostrado diversos puntos de vista. Por una parte, se considera un factor favorecedor para el crecimiento de las bacterias en superficies de procesamiento de alimentos. Por otra parte, ciertos hechos han sugerido que el sustrato tiene poca influencia en el recuento bacteriano (Harding et al., 1981). El sustrato considerado en una industria alimentaria óptimo para el crecimiento de microorganismos son los restos de suciedad en los procesos de alimentarios.

2.2. Suciedad en la industria alimentaria

La suciedad se define como la acumulación de restos de polvo, basura o impurezas. En la industria alimentaria la suciedad depende de la materia prima empleada, por lo tanto, los residuos serán específicos de cada industria. En plantas procesadoras de alimentos como puede ser una industria cárnica se detectó mayor presencia de *L. monocytogenes* en superficies sucias (*e.g.*, tablas de cortar, cintas transportadoras, contenedores) que en superficies limpias (Gómez et al., 2015). La suciedad presente se puede dividir en dos clases en función de su naturaleza: la materia orgánica o la inorgánica.

La suciedad orgánica es considerada un desecho de origen biológico, que estuvo vivo o fue parte de un ser vivo, como son las grasas, restos de alimentos, materias extrañas (*e.g.*, pelos, insectos) y deposiciones, entre otros. Por otra parte, la suciedad inorgánica se identifica como tal aquella suciedad cuyo origen procede de material que no ha formado parte de un ser vivo y, por tanto, no contiene carbono. Un ejemplo de materiales son el vidrio, la sal, el óxido, el polvo de ladrillo, etc.

La suciedad orgánica es considerada la más presente en la industria alimentaria, este hecho se debe a la utilización de los ingredientes como es el caso del almidón, materia prima que se utiliza como espesante, gelificante y agente de retención de agua (Singh et al. 2003). En los procesos industriales que se utiliza el almidón o derivados, es frecuente que los restos se adhieran a las superficies internas de tuberías y sea difícil de eliminar, sobre todo una vez que se secan (Liu et al. 2006). Además de las suciedades amiláceas, las lipídicas también están muy presentes en la industria alimentaria. Los triglicéridos pueden considerarse las sustancias más representativas de este tipo de suciedad, ya que son los constituyentes principales de las grasas animales y vegetales (Leal y Ccío, 2019).

Se sabe que la formación de biofilms depende en gran medida de las propiedades del sustrato (*i.e.*, superficies industriales en este caso), incluida la hidrofobicidad/hidrofilicidad del material o la rugosidad de la propia superficie. La adsorción de macromoléculas sobre el sustrato, también conocida como película acondicionadora, cambia las propiedades fisicoquímicas de la superficie y afecta la adhesión bacteriana (Kathryn A Whitehead et al., 2010). Además, diversas superficies que poseen poca facilidad de limpieza, por tener defectos de dimensión o distribución, tales como perforaciones, pozos, grietas, soldaduras, articulaciones, uniones o poros, se convierten en materiales más propensos a mantenerse con suciedad, incrementándose

las posibilidades de retención de residuos, así como el anclaje y crecimiento bacteriano (Taylor et al., 1998). Hoy en día, los restos de suciedad se consideran un sustrato nutritivo para el crecimiento de diversos microorganismos en una industria alimentaria. Se han hecho diversas investigaciones, y cabe destacar que hay diferentes puntos de vista, y no hay nada concluyente para afirmar que sea un factor favorecedor en el crecimiento de células bacterianas. El sustrato como es la suciedad ha sido investigado anteriormente, mostrando como favorece al crecimiento de biofilms (Harding et al., 1981). Algunos autores como K. A. Whitehead et al., (2015), Kusumaningrum et al., (2002); Allan et al., (2004); Helke y Wong, (1994) demostraron que en presencia de suciedad como restos de lechuga, carne picada, salmón ahumado, residuos de leche, pollo o carnes hubo recuento de células de *L. monocytogenes*, en acero inoxidable. Incluso en dichos estudios, también se demostró que, en presencia de antimicrobianos, las diversas cepas de *L. monocytogenes* podían crecer y sobrevivir en diversas condiciones.

2.3. Limpieza y desinfección

Las operaciones de limpieza y desinfección en la industria alimentaria se basan, primero, en eliminar los residuos no deseados como materia orgánica, cuerpos extraños, químicos y microorganismos, y en segundo lugar eliminar la contaminación microbiana, erradicando los biofilms que pueda haber presentes (Mazaheri et al., 2021). Los programas de limpieza se definen teniendo en consideración el tipo de suciedad a eliminar y las características de los productos alimenticios que se elaboran. El hecho de conocer el tipo de suciedad permite elegir los productos, sistemas y condiciones para optimizar el proceso de limpieza. Los productos de limpieza deben tener tres características importantes, primero poder quelante, habilidad de secuestrar minerales, impidiendo que puedan cristalizar, precipitar e incrustarse en los materiales. Segundo, desengrasante, con el objetivo de emulsionar y dispersar las grasas y tercero, deben ser dispersantes, para poder disgregar las partículas de suciedad y mantenerlas en suspensión (Ripolles-Avila, 2018). Tal y como señalado en anteriores secciones, la suciedad que se encuentra en la industria alimentaria puede ser a partir de materia orgánica o de materia inorgánica. En el caso de la materia orgánica, se emplean detergentes alcalinos, que suelen ser hidróxidos alcalinos, acompañados por agentes tensioactivos. Son capaces de romper proteínas gracias a la acción de iones hidroxilos, saponifican las grasas y, a altas concentraciones, pueden llegar a tener acción bactericida (Petridis et al., 2019). Por otra parte, cuando se trata de materia inorgánica, lo recomendable es utilizar detergentes ácidos que actúan como

desincrustantes, favoreciendo la eliminación de depósitos minerales derivados de los alimentos, aguas o reacciones entre ambos. Pueden ser ácidos inorgánicos como el ácido nítrico (HNO_3), ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorhídrico (HCl) y ácido sulfámico (H_3NSO_3). También pueden ser ácidos orgánicos (*e.g.*, acético, cítrico, láctico, tartárico, glucónico y adípico), que, a diferencia de los anteriores, destacan por no ser tóxicos y poco corrosivos (Ripolles-Avila, 2018).

Es importante también destacar cómo se aplican los procedimientos de limpieza y desinfección. En este caso, se clasifican en dos categorías distintas: la limpieza fuera de lugar o limpieza C.O.P. (*i.e.*, cleaning out of place) y la limpieza *in situ* o limpieza C.I.P. (*i.e.*, cleaning in place) (Asselt et al., 2002). El primero es el procedimiento de limpieza que puede ser manual o asistido por una máquina, en superficies expuestas al ambiente o con equipos desmontables. De forma general, se enjuaga, limpia y desinfecta con ayuda de instrumentos como cepillos o dispositivos a alta presión con agua caliente, detergentes y desinfectante (Berk, 2013). En cuanto al método CIP, éste es un procedimiento de éste es un procedimiento de higienización que se realiza en un sistema sin necesidad de desmontarlo, generalmente para limpiar y desinfectar tuberías o equipos internamente. Se controla el procedimiento por un programa que tiene previamente establecidos determinados tiempos y dosificaciones, como de agua y productos químicos (Srey et al., 2013). Por otra parte, la desinfección tiene por objetivo eliminar los microorganismos a niveles indetectables. En cuanto a los desinfectantes que se utilizan, destaca el peróxido de hidrógeno, el gas ozono, ácidos peracéticos, amonio cuaternario y, por último, los productos a base de cloro, ampliamente utilizados en la industria por su bajo coste económico, sin embargo, se ha demostrado resistencia por parte de las bacterias a estos productos (Anese et al., 2015; Srey et al., 2013). La eficacia de un agente microbiano se ve afectada por seis factores: i) el tamaño de la población microbiana, ii) la composición de la población, iii) la concentración del antimicrobiano, iv) la duración de la exposición, v) la temperatura y vi) factores ambientales (Montañez-Izquierdo, 2013).

Finalmente, cabe destacar que la aplicación de tan solo una limpieza, sin una desinfección, puede llegar a agravar la situación higiénica, ya que se podrían desprender fragmentos de biofilms y, al no ser eliminados, estos podrían adherirse de nuevos en otras superficies. Por esta razón es esencial una desinfección a posterior en una industria alimentaria. En la actualidad, se emplean detergentes alcalinos clorados en un solo paso como método de higienización. Este método convencional, año tras año, se evalúa y se concluye que los

patógenos se tornan cada vez más resistentes por la frecuencia de uso (Lewis, 2001), por este motivo, también el enfoque está dirigido a nuevas alternativas, que año tras año, tienen más relevancia como es el uso de detergentes enzimáticos.

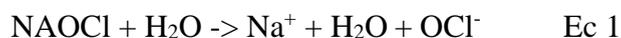
2.3.1. Detergentes alcalinos clorados

El tratamiento de superficies con soluciones alcalinas, como los detergentes clorados fuertemente alcalinos utilizados para eliminar grasas y proteínas en las instalaciones de procesamiento de carne, impartirá temporalmente propiedades hidrófilas al acero inoxidable y puede mejorar o disminuir la adherencia bacteriana a las superficies (Petridis et al., 2019).

Los detergentes más comúnmente empleados son la sosa cáustica (*i.e.*, hidróxido de sodio) y, también el hipoclorito de sodio (NaOCl) y dióxido de cloro (ClO). Son compuestos más empleados en la industria debido a su fácil aplicación, excelente poder de esterilización y rentabilidad. El uso de estos compuestos, no solo se centra en la industria alimentaria y también se utilizan en hogares, por ello, se debe tener en cuenta la concentración y la temperatura, ya que a altas temperatura se forma el cloro, gas tóxico e incoloro.

Para conseguir una tasa de eliminación rápida en plantas de elaboración de alimentos, generalmente se utilizan desinfectantes a base de cloro en concentraciones muy elevadas (Bello-Miño et al., 2017). A estas concentraciones, es muy difícil que los microorganismos sobrevivan. Sin embargo, el uso de concentraciones tan elevadas aumenta el riesgo de formación de subproductos potencialmente peligrosos (Ecuación 1 y Ecuación 2) o la producción de sabores y olores desagradables, que son la principal desventaja de la cloración (Richardson et al., 2003). Aunque a niveles bajos de cloro los microorganismos sobreviven al tratamiento, las células pueden resultar dañadas. Por consiguiente, en condiciones adecuadas, las células podrían repararse del daño celular y recuperarse (Richardson, et al., 2003). Por lo tanto, las respuestas adaptativas juegan un papel en el diseño de estrategias de control (Kim et al., 2008). El uso de detergentes a base de cloro como estrategia para eliminar los EPS ha sido discutido por autores como Samrakandi et al. (1997) y Huirong et al., (2017). Además, Kumar y Anand (1998) enumeran el cloro como uno de los productos químicos que despolimeriza el EPS. El hipoclorito de sodio es el más antiguo y el más utilizado de los compuestos de cloro empleados en desinfección química. Así, al disolverse en el agua, se produce la ionización y el ion hipoclorito establece el equilibrio con el ácido hipocloroso, como se muestra en la Ecuación 1 y la

Ecuación 2 (Lomander et al., 2004):



La acción del ácido hipocloroso se explica a través de un mecanismo de transferencia de un electrón. La carga negativa del hipoclorito ataca el núcleo rico en electrones en moléculas biológicas, como proteínas y enzimas, mostrando así una actividad antimicrobiana de amplio espectro (Petridis et al., 2019).

Se ha demostrado, evidencias de resistencia de patógenos a estos productos (Sharma et al., 2005). En diversos estudios, donde se evaluó la supervivencia de *L. monocytogenes* tras la aplicación de un tratamiento alcalino clorado, se observó que hubo crecimiento microbiano tras 48h de la limpieza y desinfección (Zhu, 2019; Baumann y Martin, 2009). Por lo tanto, la resistencia y supervivencia a métodos convencionales, como es la utilización de detergentes a base de cloro, nace la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas a estos productos. En los últimos años, se observó que el empleo de detergentes enzimáticos es una buena opción a la reducción de la utilización de métodos convencionales.

2.3.2. Enzimáticos

Las enzimas son catalizadores naturales, principalmente proteínas, que aceleran la velocidad de las reacciones químicas sin ser consumidas ni cambiar el equilibrio químico entre los reactivos y los productos. Las enzimas se clasifican en seis grupos principales, según sus características funcionales: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas o sintetasas (Shen y Chou, 2007). De entre estas categorías, las oxidorreductasas (*e.g.*, glucosa oxidasa) e hidrolasas (*e.g.*, α -amilasa, proteinasa K) son las de real interés para la eliminación de biofilms en la industria alimentaria. En el caso de las hidrolasas, actúan sobre los enlaces C-C, C-O o C-N, enlaces peptídicos de exopolisacáridos, exoproteínas y moléculas QS del biofilms (Kalpana y Aarthy, 2012; Dong et al., 2000), en cambio las oxidorreductasas catalizan las reacciones de transferencia de electrones, y su objetivo es evitar el crecimiento bacteriano mediante la producción de H_2O_2 (Ge et al., 2012; Hansen et al., 2003). En los últimos años se ha incrementado el uso de detergentes enzimáticos en la industria alimentaria, ya que se consideran alternativas ecológicas, no son perjudiciales para el medio ambiente y ayuda a reducir las aguas residuales en las fábricas (Mazaheri et al., 2021). No obstante, el

principal punto fuerte de este tipo de detergentes es la disrupción de la matriz de los biofilms. Posteriormente, las enzimas atacan las células bacterianas incrustadas en la matriz y promover la lisis celular (Algburi et al., 2017). Sin embargo, su objetivo principal es el EPS, donde rompen el enlace de célula a célula y al separar continuamente las células, degradan las macromoléculas de la matriz y aceleran la alteración del biofilm (**Figura 2**) (Erickson et al., 2013). Además, las enzimas no solo participan en la descomposición bioquímica de la molécula de la matriz, sino que también inhiben la señalización de *quorum sensing* (QS) (*i.e.*, mecanismo que regula la expresión de los genes en función de la densidad celular), degradan la adhesividad de las células desde la superficie y desactivan otras enzimas necesarias para el crecimiento microbiano (Shamsun Naha, 2018).

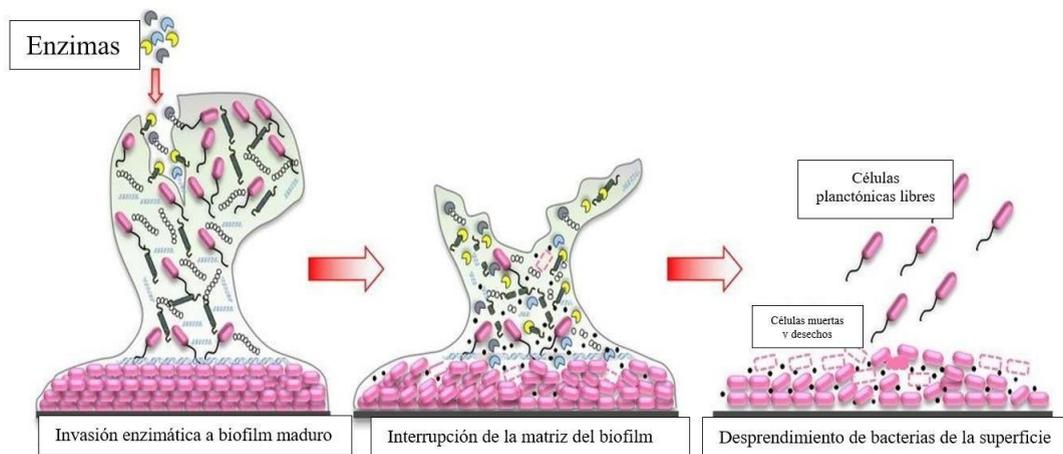


Figura 2: Diagrama esquemático que muestra el mecanismo general de actividad enzimática en una biopelícula madura donde la estructura de la biopelícula se está rompiendo y donde las bacterias regresan a su estado planctónico. Obtenido de Shamsun Naha (2018).

Investigaciones recientes se han centrado en conocer la capacidad disruptiva de los detergentes enzimáticos sobre la matriz y la reducción, consecuentemente, de la carga microbiana adherida. Al respecto, Mazaheri et al., (2021) evaluaron la eficacia de un detergente enzimático como agente alternativo para la eliminación de biofilms maduros de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable. Se demostró una efectividad aproximada de un 90% para diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Por esta razón, es interesante continuar estudiando la aplicación de enzimas en procesos de limpieza, e inclusive combinaciones con tratamientos convencionales.

2.4. Objetivos del trabajo:

- Evaluar la capacidad de formación de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies limpias, y con una capa acondicionadora de suciedad
- Evaluar la eficacia de un método convencional y un método alternativo de limpieza para el desapego de biofilms de *L. monocytogenes* en acero inoxidable
- Evaluar la supervivencia y capacidad de regeneración de células de *L. monocytogenes*
- Determinar la capacidad de supervivencia de *L. monocytogenes* a tratamiento de limpieza específicos
- Determinar la eficacia de un detergente alcalino clorado y un detergente enzimático

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Superficies de estudio

Se utilizaron discos de acero inoxidable 316, de 2 cm de diámetro y 1 mm de grosor limpiados, desinfectados y esterilizados según lo indicado por la norma europea UNE-EN 13697:2015, relativa a materiales no porosos (AENOR, 2015) referente a 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 colectividad. Además, para asegurar una esterilidad completa se autoclavaron durante 15 minutos a 121°C antes de cada ensayo.

3.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron cuatro cepas de *L. monocytogenes*, adquiridas o bien de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) o aisladas de una planta de procesamiento de cerdo ibérico (**Tabla 1**). Se seleccionaron estas cepas en base a la alta probabilidad de presencia en procesadoras de alimentos (*i.e.*, cepas serotipo 1/2a) o mayor patogenicidad (*i.e.*, cepas serotipo 4b). De este modo, se podría realizar un análisis comparativo de la reacción de distintos serotipos frente a diferentes procesos de limpieza y desinfección.

Tabla 1: Cepas de *L. monocytogenes* sujetas a estudio.

Cepa	Serotipo	Origen
5672	4b	CECT
935	4b	CECT
S2-bac	1/2a	Ortiz et al., (2014)
EDG-e	1/2a	Ortiz et al., (2016)

3.3. Generación de una capa de suciedad en discos de acero inoxidable

Se procedió a crear una capa acondicionadora de suciedad en discos de acero inoxidable para poder comparar condiciones sucias con limpias. Para ello y utilizando una cabina de flujo laminar, se colocaron los discos de acero inoxidable en placas de Petri estériles y se dispersaron por todo el disco 50 µl de caldo de pollo esterilizado previamente (*i.e.*, 121°C/15 min). Posteriormente, los discos se colocaron, manteniendo las condiciones estériles, en una estufa y se secaron a 50°C durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de la inoculación

3.4. Preparación del inóculo y formación de biofilms monoespecie

Para la formación de los biofilms monoespecie se procedió, inicialmente, a la siembra de varias colonias de las cuatro cepas de *L. monocytogenes* en una placa de TSA y se incubó a 37°C durante 24 h. A continuación, se procedió a la preparación del inóculo, inoculando para ello varias colonias de estos cultivos en tubos de 10 ml TSYEB_{gluc1%+NaCl2%} hasta llegar a una turbidez de 0,1-0,2 unidades McFarland. Para la formación de los biofilms se sembraron 30 µl de la suspensión de las diferentes cepas de *L. monocytogenes* en el centro de cada disco de acero inoxidable. Con el objetivo de realizar la comparativa entre condiciones sucias y limpias, se emplearon los discos con la capa de suciedad acondicionadora preparada en la previa sección (*i.e.*, condiciones sucias) y discos estériles (*i.e.*, condiciones limpias). Finalmente, las superficies inoculadas y dispuestas en placas de Petri estériles fueron introducidas en una cámara húmeda para promover la formación de las estructuras durante 72 h a 30°C (Fuster et al., 2008).

3.5. Tratamientos de limpieza y desinfección

Se aplicaron dos tratamientos distintos de limpieza y desinfección. El primer tratamiento de limpieza fue el considerado como convencional al emplear un detergente alcalino clorado (Clorajet, iTram Higiene, Vic, España), que es un producto que se emplea mucho en

la industria alimentaria. El segundo tratamiento fue el considerado como alternativo en dos pasos, que consiste en la combinación del detergente alcalino clorado empleado anteriormente y un detergente enzimático (EnzyJet, iTram Higiene, Vic, Spain), como una alternativa combinada de optimización y aumento de la efectividad del tratamiento. Todos los agentes limpiadores se diluyeron al 1% en agua dura (**Tabla 2**). El agua dura se obtuvo siguiendo la normativa UNE-EN 13697:2015, mezclando 3 ml de una solución A [1,984g de MgCl₂ (Sigma, Madrid, España) y 4,624 g de CaCl₂ (Sigma, Madrid, España) en 100ml de agua destilada], 4 ml de solución B [3,505 g de NaHCO₃ (Panreac Applichem, Madrid, España) en 100 ml de agua destilada] y 100 ml de solución interferente [1,5 g albúmina de suero bovino (Sigma, Madrid, España) en 100 ml de agua destilada] y se llevó a un volumen de 500 ml con agua destilada estéril. Todas las soluciones se esterilizaron, previamente a la mezcla, por filtración con membrana (Millex-GP 0,22 μm, Merck, Barcelona, España).

Tabla 2: Agentes limpiadores empleados en los tratamientos de limpieza

Agentes limpiadores	Principio activo/ Composición	Temperatura de uso (°C)	Concentración de uso (%)
Alcalino clorado	Hipoclorito de sodio (NaClO) y hidróxido de sodio (NaOH)	20-22	1
Enzyjet enzimático	Lauriléter glicolato de sodio etoxilado(1,1), N-óxido de N,N-dimetil-C12-C14-alkilamina, Contiene tensioactivos aniónicos < 5 %, tensioactivos no iónicos < 5 %, enzimas incluido proteasas < 5 % y fenoxietanol	50	1

3.6. Procedimiento de limpieza. Convencional y alternativo

Se procedió a lavar los discos dos veces con 3 ml de agua destilada estéril (*i.e.*, con suciedad y sin suciedad) y, posteriormente, se colocaron en un frasco estéril, en el caso del tratamiento convencional, 3 ml del producto de limpieza correspondiente en los frascos que contenían las muestras. El tratamiento alcalino clorado se realizó durante 15 minutos 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

ubicandolos discos en frascos estériles con perlas de vidrio y neutralizante para su posterior cuantificación. Paralelamente, el primer paso del tratamiento combinado se realizó con alcalino clorado, por lo cual, el procedimiento fue el mismo comentado anteriormente. A continuación, los discos correspondientes al tratamiento alternativo se colocaron, finalizado el tratamiento alcalino clorado, en otro frasco estéril con 3 ml de un producto enzimático, llevándose a 50°C (temperatura óptima) en un baño durante 15 min con agitación. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se enjuagaron con 3 ml de agua destilada estéril se procedió a su cuantificación tal y como realizado para el caso del tratamiento con únicamente alcalino clorado.

Posteriormente, se transfirió los discos de control (*i.e.*, en condiciones limpias y no limpias) y los discos sometidos a tratamientos de limpieza en frascos estériles, que contenía 3,5g de perlas de vidrio (2 mm de diámetro) y 10 mL de solución neutralizante [1g de triptona (BD, Madrid, España), 8,5 g de NaCl (Panreac, Castellar del Vallès, España), 30 g de Tween 80 (Scharlab, Barcelona, España) por litro de agua destilada (pH= 7,0 ±0,2)], se procedió a su cuantificación mediante el método TEMPO.

3.7. Tratamiento de supervivencia de biofilms monoespecie a procedimientos de limpieza

Seguidamente a los tratamientos de limpieza, se colocaron los discos de acero inoxidable, que fueron evaluados para la supervivencia y regeneración de la estructura, en una placa de Petri. Posteriormente, la renovación del medio de cultivo se llevó a cabo añadiendo asépticamente 30 µl de TSYEB_{gluc1%+NaCl2%}, en el centro de los discos, para promover el crecimiento de las células adheridas que hubieran resistido al tratamiento y así inducir la formación de biofilms. Los discos se introdujeron nuevamente en una cámara húmeda durante 24 h a 30°C. Finalizada la incubación, se limpiaron los discos en dos pasos, 3 ml y 3 ml, con agua destilada estéril y, se colocaron en frascos con perlas de vidrio y se procedió a su cuantificación.

3.8. Cuantificación de biofilms mediante TEMPO

Los frascos se agitaron en vórtex durante 90 segundos a una frecuencia de 40 Hz con el objetivo de recuperar las células adheridas a la superficie mediante la fricción de las perlas (Ripolles-Avila et al., 2019). A continuación, se realizaron una serie de diluciones decimales con el objetivo de reducir la carga microbiana obtenida tras el tratamiento y

poder obtener resultados interpretables. La cuantificación se hizo mediante el sistema cuantitativo TEMPO (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Para ello, los viales de TEMPO se hidrataron con 3 ml de agua destilada estéril, seguidamente se transfirió 1 ml de la muestra problema analizar y se vorteo para garantizar la homogenización de su contenido y a través de la unidad de llenado, el contenido de los viales se distribuyó en las tarjetas, compuestas por 48 pocillos con 3 volúmenes diferentes, se registró en el sistema y se incubó durante 48h a 30°C. Tras ese periodo se procedió a la lectura de resultados mediante la unidad de lectura TEMPO reader.

3.8. Análisis estadístico

Para todos los ensayos realizados, se hicieron triplicados en tres días independientes (n = 9) para cada especie, condición y tratamiento. Los resultados se evaluaron como valores logarítmicos decimales. Se analizaron mediante el paquete IBM SPSS, se realizó " One Way ANOVA ", " Two Way ANOVA " seguido del contraste de Tukey Test para observar posibles diferencias entre cada uno de los datos obtenidos. Considerando valor estadísticamente significativo $P < 0,05$.

4.Resultados y discusiones

4.1. Formación de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies con y sin suciedad

El objetivo principal de este ensayo fue evaluar la capacidad de formación de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable con una capa acondicionadora de suciedad, en este caso, caldo de pollo, simulando los posibles restos en una industria cárnica, y en condiciones limpias, que reflejan las condiciones después de la aplicación de un proceso de higienización. Los resultados obtenidos a nivel de especie (*i.e.*, incluyendo las cuatro cepas bajo estudio) se muestran en la **Tabla 3**. Tal y como se observa, el microorganismo fue capaz de adherirse y formar biofilms en ambas condiciones ensayadas, aunque con tendencias distintas. En este sentido, se obtuvo un mayor recuento celular cuando la superficie se encontraba limpia que cuando ésta contenía la capa acondicionadora, a pesar de no encontrar diferencias significativas ($P = 0,175$). Esto pudo deberse a que la cantidad de nutrientes (*e.g.*, proteínas, polisacáridos) añadida fue insuficiente, como para observar diferencias entre los discos recubiertos y no recubiertos. Además, en diversos estudios, los cuales también se evaluó como factor la suciedad como un caldo de pescado, se observó que la formación de biofilms de *L.*

monocytogenes en superficies sucias fue menor que en superficies limpias (Costa et al., 2016). Por ello, sería interesante probar diferentes capas de suciedad o restos, los cuales simulen mejor una condición de suciedad de una industria alimentaria, y ver si ello afecta al crecimiento bacteriano. Este resultado también coincide con Simões, (2010), el cual, demostró que la suciedad orgánica, es utilizada como sustrato para la formación de biofilms. No obstante, en este estudio, el tiempo de incubación fue corto, lo que no produce un biofilm maduro, y, por tanto, no se podría traducir en un resultado aplicable a la industria alimentaria.

Tabla 3: Recuento celular de *L. monocytogenes* (Log UFC/cm²) conformando biofilms en superficies limpias y sucias. Los valores corresponden a la media \pm desviación típica (n = 36).

Microorganismo	Condiciones		P-value
	Limpias	Sucias	
<i>Listeria monocytogenes</i>	6,63 \pm 0,42	5,71 \pm 0,60	0,175

Paralelamente a los resultados a nivel de especie, se evaluó la formación de biofilms respecto a cada grupo sujeto de estudio en ambas condiciones para visualizar con mayor detalle la respuesta de distintas cepas de este microorganismo a diferentes condiciones en la superficie a la cual se adhieren.

4.1.1. Influencia de las cepas en la formación de biofilms

En diversos estudios, se observó que *L. monocytogenes* tiene la capacidad de adherirse rápidamente en superficies de acero inoxidable formando biofilms a niveles que van de 4 a 6 log UFC/cm² (Mattos et al., 2010), aunque los resultados varían según la cepa de estudio (Ortiz et al., 2014). Diversos autores han intentado relacionar grupos de cepas (*e.g.*, serotipo) con atributos específicos (*e.g.*, formación de biofilms), aunque no se ha podido hallar una relación directa entre la formación de biofilms y el serotipo al que pertenecen hasta el día de hoy, al haber resultados contradictorios (Kadam et al., 2013; Ripolles-Avila et al., 2019). En el presente estudio, los serotipos empleados fueron 1/2a (*i.e.*, cepas S2-bac y EDG-e), por su elevada y continua presencia en plantas procesadoras de alimentación (Ortiz et al., 2010), y 4b (*i.e.*, cepas CECT 5672 y CECT 935), que representa la mayoría de los casos de listeriosis en humanos (Jamshidi, 2019). En la **Tabla 4** se muestran los resultados del recuento de células adheridas a la superficie por cepa empleada en el estudio. A nivel estadístico, no se observaron diferencias entre las cuatro cepas de *L. monocytogenes* ($P = 0,232$) en condiciones limpias, aunque en con una capa de suciedad sí que hubo diferencias significativas entre las cepas EDG-e y S2-bac con

respecto a la cepa CECT 5672 ($P= 0,001$; $P= 0,017$). Este hecho se podría explicar como que ambas cepas fueron las que menos biofilms formaron en estas condiciones y CECT 5672, fue la mayor formadora de biofilms de las cepas de estudio.

Sin embargo, evaluando el factor de la suciedad, si está presente o no, se observó diferencias significativas para S2-bac y EDG-e, ya que, hubo mayor recuento de células adheridas en condiciones limpias que en condiciones sucias. Este resultado coincide con diversos estudios, en los cuales, se observó que dichas cepas formaron más biofilms en condiciones higiénicas, que no en condiciones sucias, este hecho no se ha podido relacionar con el serotipo, ya que, ambas pertenecen al serotipo 1/2a, pero una posible respuesta podría ser que, los biofilms están formados por residuos orgánicos, sustancias poliméricas extracelulares, proteínas y fosfato cálcico (Flint et. al., 1997; Mittelman, 1998), por lo que algunos autores consideran que los restos orgánicos pueden establecer depósitos y favorecer el desarrollo de los microorganismos (Simões, 2010). Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el recubrimiento de los discos, con una capa acondicionadora de suciedad, no modifica en ningún sentido la adherencia de las bacterias a la superficie. Esto pudo deberse a que la cantidad de proteína añadida fuera insuficiente, como para observar diferencias entre los discos recubiertos y no recubiertos. O bien, a que *L. monocytogenes* alcanzó su fase estacionaria de crecimiento en ambas condiciones estudiadas.

Tabla 4: Recuento celular de diferentes cepas de *L. monocytogenes* (Log UFC/cm²) conformando biofilms en condiciones limpias y sucias. Los valores corresponden a la media \pm desviación típica (n= 9).

Cepa	Condición limpia	Condición Sucia
5672	6,75 \pm 0,23 ^{Aa}	6,21 \pm 0,59 ^{Aa}
935	6,41 \pm 0,45 ^{Aa}	5,71 \pm 0,32 ^{BAa}
S2-bac	6,57 \pm 0,52 ^{Aa}	5,24 \pm 0,52 ^{Ab}
EDG-e	6,78 \pm 0,39 ^{Aa}	5,51 \pm 0,40 ^{Bb}

^{A-C} los valores dentro de una columna sin un superíndice común difieren significativamente ($P < 0,05$).

^{a-b} las medias dentro de una fila sin un superíndice común difieren significativamente ($P < 0,05$).

Seguidamente, el objetivo fue evaluar la aplicación de dos tratamientos de limpieza, un tratamiento convencional y otro alternativo, con la finalidad de observar la efectividad de dichos tratamientos y además de poder relacionar a nivel industrial si serian convenientes su aplicación y, además, si se observa resistencia de *L. monocytogenes* a dichos tratamientos.

4.2. Eliminación de biofilms mediante la aplicación de dos tratamientos de limpieza

En este estudio, se observó la efectividad de dos tratamientos de limpieza para la eliminación de biofilms de diferentes cepas de *L. monocytogenes* formados en dos condiciones distintas, con una capa acondicionadora de suciedad y en condiciones higiénicas. Para ello, se aplicó un método convencional mediante el empleo de un producto químico, un alcalino clorado, compuesto habitualmente utilizado en la industria alimentaria, y paralelamente se empleó la combinación de un alcalino clorado (*i.e.*, método convencional) con el objetivo de eliminar la materia orgánica y destruir parte de la matriz producida por los biofilms y posteriormente, la aplicación de un enzimático (*i.e.*, método alternativo) con el objetivo de eliminar por completo la matriz del biofilms y disgregar toda la estructura para despegar las células de la superficie.

En modo general, hubo reducción de células adheridas en los cupos de acero inoxidable en comparación con sus controles. La aplicación del detergente de limpieza alcalino clorado provocó cierta reducción, pero, como se esperaba, no fueron capaces de eliminar las bacterias adheridas. En la **Tabla 5** se muestra dicha reducción que oscila entre 0,40-3,16 Log UFC/cm² en ambas condiciones, y para el caso del tratamiento combinado, la reducción fue entre 4,15-6,39 Log UFC/cm², también en las distintas condiciones de estudio. Estos resultados, no mostraron una tendencia general, es decir, fue independiente de cada cepa de estudio de

L. monocytogenes, aunque, la única cepa que mostró tener mayor desprendimiento fue S2-bac con los diferentes tratamientos aplicados, pero la que menor respuesta mostró en el caso del tratamiento alcalino clorado en condiciones higiénicas, fue la cepa CECT 5672 y CECT 935 en condiciones sucias, y para el tratamiento combinado, se trató de la cepa EDG-e, en ambas condiciones.

Siguiendo más al detalle, con el tratamiento de limpieza del alcalino clorado, en condiciones higiénicas, se observó diferencias significativas entre las cepas CECT 5672 y CECT 935 ($P = 0,033$), aun perteneciendo al mismo serotipo 4b la respuesta fue distinta para ambas cepas. Esto se podría deber a que la cepa CECT 5672 fue la cepa con mayor recuento de células adheridas tras la aplicación de la limpieza, y CECT 935 la que menor recuento seguido de S2-bac, por lo cual, mostró esta diferencia.

Sin embargo, la cepa S2-bac, fue la que mayor disgregación de células adheridas mostró en condiciones higiénicas de hasta 2,66 Log UFC/cm² y 3,10 Log UFC/cm² en condiciones sucias. Estudios previos, también han observado, que el empleo de detergentes alcalinos clorados para tratamientos de limpieza de biofilms, también es

efectivo, (da Silva Fernández et al., 2015;). Por ejemplo, observaron que, el uso de dichos detergentes, como proceso de higienización, reducían de forma significativa los recuentos de biofilms, 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. Estos resultados también siguen en línea con otros autores como Barroso et al., (2019) que han observado una respuesta similar tras la aplicación de un tratamiento convencional. 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.

En el caso del tratamiento alternativo, en condiciones higiénicas únicamente hubo diferencias significativas entre la cepa EDG-e y CECT 5672 y CECT 935 ($P=0,022$, $P=0,017$). Este hecho, también se observó en el caso de condiciones no limpias, ya que, hubo diferencias significativas entre cepa EDG-e y CECT 5672, CECT 935 y S2-bac ($P=0,001$, $P=0,001$, $P=0,001$). Esto sugiere, que la cepa EDG-e de *L. monocytogenes* mostró mayor resistencia en ambas condiciones, ya que tuvo mayor recuento de células adheridas a los cupos de acero inoxidable. El motivo podría estar relacionado con que fue la cepa mayor formadora de biofilms, ya que, el resultado de su control en condiciones limpias fue 6,78 Log UFC/cm² y en condiciones no higiénicas 5,51 Log UFC/cm². Además, el hecho que sea serotipo 1/2a, el cual es caracterizado por ser persistente en procesadoras de alimentos y resistente a diversos biocidas (Strains, 2019; Rieu et al., 2008), se relaciona con los datos obtenidos de mayor resistencia a dicho tratamiento. Esta explicación también se sugiere para el tratamiento alcalino clorado para la cepa EDG-e ya que, con dicho tratamiento tampoco mostró mayor desprendimiento en condiciones higiénicas ni en condiciones sucias.

Por otra parte, cabe destacar que la cepa S2-bac fue la que mostró mayor disgregación con el tratamiento combinado, aunque la incubación fue de 72h, otros autores como Mazaheri et al., (2020) mostraron resultados similares tras la aplicación de un tratamiento con enzimas, pese a que su estudio se enfocó en biofilms maduro hubo un similar resultado de desprendimiento, esto podría sugerir, que la matriz del biofilms de la cepa S2-bac era menos robusta en nuestro caso, por lo cual, el tratamiento fue más efectivo en este estudio. Por eso estaría bien llevar a cabo un estudio de dicho tratamiento combinado con biofilms maduros, es decir, tras una semana de incubación. No obstante, también sería

interesante añadir al presente estudio una desinfección tras la aplicación del tratamiento combinado, ya que, la disgregación obtenida aumentaría más, de forma que se potenciaría la acción del tratamiento alternativo y por tanto se obtendrían resultados más efectivos. Este punto podría considerarse como un paso posterior para mejorar la efectividad del tratamiento combinado aplicado, ya que las enzimas habrán eliminado el ECM del biofilm, por lo que las células estarán más expuestas a la acción de un desinfectante (Nguyen y Burrows, 2014; Puga et al., 2018).

Respecto al factor de suciedad, se ha observado diferencias significativas según la cepa de estudio en el tratamiento de limpieza aplicado. Se observa en la tabla que S2-bac y CECT 5672 difieren en cuestión de las condiciones aplicando el tratamiento convencional (*i.e.*, alcalino clorado), autores como K. A. Whitehead et al., (2015), demostraron que aplicando tratamientos antimicrobianos en presencia de suciedad como restos de lechuga, carne picada y salmón ahumado, hubo recuento de células de *L. monocytogenes*, en esta misma línea, Kusumaningrum et al., (2002); Allan et al., (2004); Helke y Wong, (1994), también observaron la presencia de *L. monocytogenes* en condiciones de suciedad como residuos de leche, pollo o carnes, demostrando que dichos restos pueden proteger al microorganismo de la exposición de tratamientos de limpieza en acero inoxidable. Cabe destacar, que estos hechos, únicamente se observó para el tratamiento con el alcalino clorado, ya que, para el tratamiento alternativo, no se apreciaron diferencias significativas.

Tabla 5: Células de *L. monocytogenes* restantes dentro de la estructura del biofilms residual (LogUFC/cm²) después del tratamiento alcalino clorado y combinado en condiciones limpias y con suciedad. Los valores corresponden a la media \pm desviación típica (n = 9).

Cepas	Condición limpia		Condición sucia	
	Alcalino clorado	Combinado	Alcalino clorado	Combinado
5672	6,35 \pm 0,18 ^{Ca}	0,19 \pm 0,36 ^{Aa}	4,75 \pm 0,28 ^{Bb}	0,17 \pm 0,17 ^{Aa}
935	5,16 \pm 1,08 ^{Ba}	0,46 \pm 0,70 ^{Aa}	4,87 \pm 0,67 ^{Ba}	0,11 \pm 0,11 ^{Aa}
S2-bac	3,91 \pm 0,94 ^{Aa}	0,18 \pm 0,37 ^{ABa}	2,14 \pm 1,31 ^{Ab}	0,00 \pm 0,00 ^{Aa}
EDG-e	5,73 \pm 0,89 ^{BCa}	1,40 \pm 1,19 ^{Ba}	4,19 \pm 0,23 ^{Ba}	1,36 \pm 0,79 ^{Ba}

4.2.1. Evaluación de la efectividad de los diferentes tratamientos de limpieza

Seguidamente, se calculó el porcentaje de desprendimiento de biofilms por las diferentes cepas de *L. monocytogenes* después del tratamiento alcalino clorado y el combinado para visualizar la efectividad global de cada tratamiento (**Figura 5**).

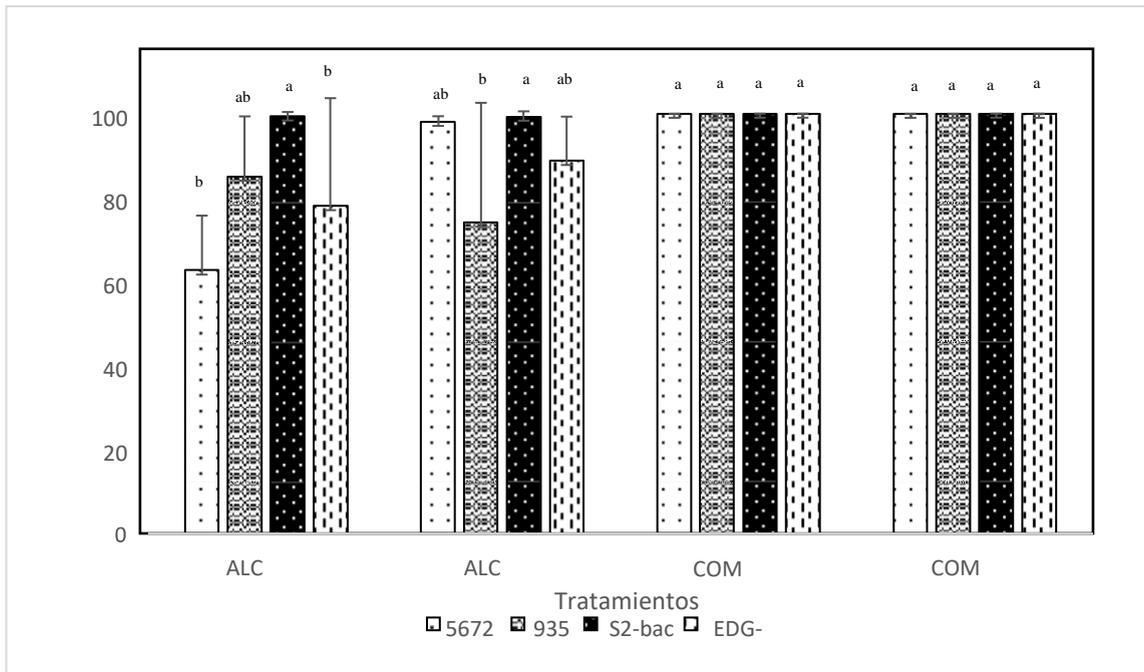


Figura 3: Porcentaje de desprendimiento de diferentes cepas de *L. monocytogenes* después de la aplicación del tratamiento Alcalino clorado (ALC) y el tratamiento combinado.

Se obtuvo un porcentaje para el tratamiento alcalino clorado que oscilaba entre 60-99%, un rango muy amplio para afirmar que el tratamiento fue completamente eficaz en la eliminación de células que conforman los biofilms adheridos al acero inoxidable. Este porcentaje coincide con diversos estudios donde se demostró que hubo desprendimiento en ambas condiciones, y que inclusive fue mayor con una capa acondicionadora de suciedad (Dygico et al., 2020; Aarnisalo et al., 2000; Sharma et al., 2005). Esto se puede deber al diseño de estos productos, que tiene como objetivo eliminar la materia orgánica presente, aunque también estas sustancias orgánicas en los medios utilizados pueden interferir con la actividad del cloro y no mostrar una efectividad aún mayor (Waters y Hung, 2014). Cabe destacar que la cantidad de células de biofilms restante en la superficie, una vez aplicado el tratamiento, sugieren que el microorganismo sigue presente e inclusive puede formar biofilms más resistentes, lo que implicaría una contaminación cruzada, entre el periodo en que se llevaría a cabo otro proceso de higienización. No obstante, los resultados para el tratamiento combinado muestran un rango de efectividad del 99-100%, este porcentaje nos señala que la combinación de un alcalino clorado y posteriormente un enzimático fue eficaz para la eliminación de biofilms, un motivo podría ser, que el alcalino clorado actúa primero eliminando la capa protectora de los biofilms y las enzimas dispersan dicha estructura (Chen et al., 2018). Algunos autores, consideran que la combinación de un tratamiento convencional (*e.g.*, hipoclorito de sodio, amonio cuaternario) y un alternativo (*e.g.*, enzimático) es una alternativa eficaz e incluso la aplica-

ción únicamente de un enzimático, ya que, mostraron en todo momento efectividad que oscilaban en un 90% (Mazaheri et al., 2020; Puga et al., 2018). Aunque otros autores analizaron la aplicación de una combinación en el sentido inverso que, en el presente estudio, es decir, primero la aplicación del enzimático y posteriormente, un alcalino clorado como agente desinfectante (Fagerlund et al., 2020; Tang et al., 2010), se observó un porcentaje de eficacia alrededor del 90%. Esta elevada efectividad sobre la disgregación de biofilms producidos por *L. monocytogenes* podría deberse a que tienen en su mayoría una composición proteica, y el detergente enzimático empleado en este estudio contiene proteasas. Asimismo, autores como Huang et al., (2014) obtuvieron como resultados tras la aplicación de diversos tipos de enzimas como agente limpiador para la eliminación de biofilms que un tratamiento enzimático con proteasas fue más efectivo comparado con amilasa (Ripolles-Avila, 2018). Esto implicaría una nueva búsqueda de combinación de enzimas para optimizar la efectividad del tratamiento.

Por otra parte, los resultados obtenidos respecto a la efectividad del tratamiento, podría depender de la robustez de la matriz generada por *L. monocytogenes* tal y como señalado en otro estudio (Ripollés-Avila et al., 2020), con lo cual, cepas como EDG-e que mostró una efectividad menor respecto a las otras cepas, podría haber generado una matriz más robusta.

Para un mejor contraste de información en relación con la supervivencia de *L. monocytogenes*, se adicionó TSYEB a los discos y se dejó incubar durante 24h posteriores, para analizar si dichas cepas de *L. monocytogenes* mostraban una rápida respuesta en cuanto al recuento de células adheridas al acero inoxidable.

4.3. Supervivencia celular de *L. monocytogenes*

La capacidad de las bacterias para sobrevivir en las superficies en contacto con los alimentos se ha informado anteriormente (Bremer et al., 2001; Chaitiemwong et al., 2010; Wong, 1998). La supervivencia está influenciada por la cepa bacteriana, la temperatura, el tiempo, la humedad, la disponibilidad de nutrientes, el pH, la presencia de inhibidores y el tipo de material de la superficie (Allan et al., 2004). Además, se ha demostrado que *L. monocytogenes* es un patógeno difícil de erradicar y que, además, tiene diferentes mecanismos de supervivencia y resistencia a métodos de limpieza y desinfección establecidos hasta el día de hoy en la industria alimentaria (Somers y Lee Wong, 2004). Por este motivo, se evaluó, tras 24 horas del tratamiento de limpieza, el recuento de células adheridas en los cupones de acero inoxidable. Estos resultados, se evaluarán a

continuación en función de la respuesta de cada cepa de *L. monocytogenes*. Los resultados obtenidos muestran que las cepas de *L. monocytogenes* sobrevivieron en ambas condiciones, e indistintamente del tratamiento de limpieza aplicado. Además, no se pudo obtener una relación directa entre la cepa y el crecimiento microbiano posterior a la limpieza, ya que, hubo diferencias significativas según la cepa de estudio. De modo general, para la supervivencia tras la aplicación del tratamiento alcalino clorado en condiciones limpias se mostró que hubo mayor crecimiento de células adheridas que sus propios controles. Para el caso del tratamiento alcalino clorado en condiciones de suciedad, también mostró una supervivencia mayor, llegando a valores similares a sus controles, lo que implicaría, que dichas cepas no crecen de manera óptima con una capa de suciedad, ya que, la suciedad fue retirada anteriormente con el tratamiento de limpieza. No obstante, estos hechos, confirman que este patógeno tiene mecanismos rápidos de supervivencia y una elevada resistencia a productos alcalinos clorados, como se ha observado en diversas investigaciones (Mustapha y Liewen, 1989; Nahar, 2018). Esto conllevaría a una problemática en una industria alimentaria, ya que, en la actualidad, se aplica con frecuencia este tratamiento como limpieza y desinfección en un solo paso, por lo tanto, en base a estos resultados, el rápido crecimiento puede provocar importantes problemas de higiene, ya que, tras 24h hay mayor recuento de células adheridas en las superficies de acero inoxidable. Esto también podría implicar, utilizar tratamientos agresivos como puede ser múltiples ciclos de limpieza seguidos, ya que, de esta forma se debilitaría y dispersaría la estructura del biofilm, con lo cual, con lleva a importantes pérdidas económicas (Bremer et. al., 2006; Gram et. al., 2007).

Por otra parte, los resultados obtenidos con el tratamiento combinado, también se apreció crecimiento en ambas condiciones, pero se debe tener en cuenta que es un tratamiento alternativo, sin desinfección, por lo cual la supervivencia de este patógeno podría incluso ser inferior a los resultados obtenidos, ya que este paso podría darnos resultados más eficaces. Anteriores estudios, han demostrado que las cepas más virulentas, que mayor número de casos de listeriosis provocan, son las que presentan una mayor adherencia en superficies de acero inoxidable (Norwood y Gilmour, 1999). En este caso, el serotipo 4b, se trata del serotipo que mayor caso de listeriosis presenta, correlacionando este hecho, con los resultados mostrados, se observó que CECT 5672 y CECT 935 mostraron mayor crecimiento y resistencia a los tratamientos de limpieza aplicados independientemente de las condiciones (**Tabla 6**), por lo cual, en el caso de la cepa EDG-e, también hubo crecimiento, pero el recuento tras la aplicación de la limpieza del tratamiento combinado

era mayor que para el caso de CECT 5672 y CECT 935. Por otro lado, algunos autores han observado que determinadas especies producen ciertos compuestos que resultan beneficiosos para toda la comunidad. Por ejemplo, la secreción de enzimas como una hidrolasa de *P. aeruginosa* (Lee y col., 2014) o proteínas de tipo amiloide (Zhou y col., 2012). En los últimos tiempos, se ha postulado que la capacidad para sobrevivir a los agentes antimicrobianos de una población de bacterias en un biofilm es un fenómeno multifactorial que tiene que ver directa e indirectamente con la estructura tridimensional y la matriz, y esto conlleva varios mecanismos de difusión limitada de los compuesto a través de esta estructura, capacidad que adquieren las células para degradar dichos compuestos, expresión de otros mecanismos genéticos específicos de biofilm y presencia de células persistentes entre otros.

Tabla 6: Recuento microbiano de *Listeria monocytogenes* dentro de la estructura del biofilm residual (Log UFC /cm²) después de la aplicación del tratamiento alcalino clorado o combinado tras 24h. Los valores corresponden a la media \pm desviación típica (n = 9).

Cepas	Condición limpia		Condición sucia	
	Alcalino clorado	Combinado	Alcalino clorado	Combinado
5672	7,00 \pm 0,24 ^{Ba}	2,92 \pm 0,36 ^{Bb}	6,17 \pm 0,60 ^{Bb}	2,63 \pm 0,82 ^{ABb}
935	6,01 \pm 0,47 ^{Aa}	2,56 \pm 0,70 ^{Bb}	4,96 \pm 0,93 ^{ABa}	2,14 \pm 0,78 ^{Bab}
S2-bac	6,69 \pm 0,42 ^{Ba}	0,59 \pm 0,37 ^{Aa}	4,07 \pm 1,81 ^{Ab}	1,25 \pm 1,10 ^{Aa}
EDG-e	6,60 \pm 0,56 ^{Ba}	3,50 \pm 1,19 ^{Bb}	6,00 \pm 0,63 ^{BCb}	2,82 \pm 0,65 ^{Bb}

^{A-C} las medias dentro de una columna sin un superíndice común difieren significativamente ($P < 0,05$).

^{a-b} las medias dentro de una columna sin un superíndice común difieren significativamente ($P < 0,05$).

Esta supervivencia puede presentar un riesgo de contaminación cruzada, por este motivo, sería interesante estudiar durante un periodo, el crecimiento bacteriano tras un proceso de limpieza de *L. monocytogenes*, para posteriormente establecer ciclos de limpieza más frecuentes o tratamientos de limpieza, que puedan garantizar una supervivencia menor.

6. Conclusiones

- 1 El crecimiento de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable con una capa acondicionadora de suciedad es diferentes que en condiciones higiénicas. Este microorganismo presenta una tasa de crecimiento bajo en comparación con el recuento de células adheridas en superficies limpias.
- 2 Los resultados indican que los procedimientos de limpieza fueron efectivos para reducir la presencia de microorganismos, pero no pudieron eliminarlos por completo.
- 3 La efectividad de los dos métodos de limpieza aplicados para la eliminación de biofilms de *L. monocytogenes* mostraron que el tratamiento convencional (*i.e.*, alcalino clorado) es menos efectivo que el tratamiento alternativo (*i.e.*, combinación de alcalino clorado y enzimático).
- 4 Los resultados de supervivencia mostraron que el microorganismo, no es únicamente resistente a diversos tratamientos de limpieza, sino que es capaz de establecer mecanismos de crecimiento rápidos tras 24 h de haberse efectuado los tratamientos.
- 5 No se ha podido establecer una relación directa entre el serotipo al que pertenecen las cepas estudiadas y las respuestas a diferentes condiciones ambientales, e inclusive entre cepas del mismo serotipo.
- 6 Se sugiere seguir con este estudio para determinar si el tratamiento combinado resultaría igual de efectivo para biofilms maduros, y evaluar, además, la supervivencia de forma periódica, para visualizar el tiempo de crecimiento del biofilm después de la aplicación de un tratamiento de higienización y si observar, si la matriz del biofilm es más robusta, una vez aplicado el tratamiento de limpieza.

7 Bibliografía

Aarnisalo, K., Lundén, J., Korkeala, H., & Wirtanen, G. (2007). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, 40(6), 1041–1048.

Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M. L., Wirtanen, G., Autio, T., Lundén, J., Korkeala, H., & Sjöberg, A. M. (2000). Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, 20(4), 237–250.

Korkeala, H., & Sjöberg, A. M. (2000). Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, 20(4).

Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2017). *Control of Biofilm Formation: Antibiotics*. 83(3).

Anese, M., Bot, F., Panozzo, A., Mirolo, G., & Lippe, G. (2015). Effect of ultra-sound treatment, oil addition and storage time on lycopene stability and in vitro bioaccessibility of tomato pulp. *FOOD CHEMISTRY*, 172, 685–691

Allan, J. T., Yan, Z., Genzlinger, L. L., & Kornacki, J. L. (2004). Temperature and biological soil effects on the survival of selected foodborne pathogens on a mortar surface. *Journal of Food Protection*, 67(12), 2661–2665.

Baumann, A. R., & Martin, S. E. (2009). *Removal of Listeria monocytogenes Biofilms from Stainless Steel by Use of Ultrasound and Ozone*. 72(6), 1306–1309.

Berk, Z. (2013). Cleaning, Disinfection, Sanitation 28.1. *Food Process Engineering and Technology*, 637–650

Byun, K., Ha, S., Yoon, J., Hong, S., & Ha, S. (2021). Efficacy of chlorine-based disinfectants (sodium hypochlorite and chlorine dioxide) on *Salmonella Enteritidis* planktonic cells, biofilms on food contact surfaces and chicken skin. *Food Control*, 123(December 2020), 107838.

Bremer, P. J., Monk, I., & Osborne, C. M. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *Journal of Food Protection*, 64(9), 1369–1376.

Chaitiemwong, N., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2010). International Journal of Food Microbiology Survival of *Listeria monocytogenes* on a conveyor belt material with or without antimicrobial additives. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 260–263.

Chasseignaux, E., Ge, P., Colin, P., & Ermel, G. (2002). *Ecology of Listeria monocytogenes in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants*. 210, 271–275.

Chen, Z., Wang, Z., Ren, J., & Qu, X. (2018). *Enzyme Mimicry for Combating Bacteria and Biofilms*.

Colagiorgi, A., Bruini, I., Aldo, P., Ciccio, D., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes Biofilms in the Wonderland of Food Industry*.

Costa, A., Bertolotti, L., & Brito, L. (2016). *Biofilm Formation and Disinfectant Susceptibility of Persistent and Nonpersistent Listeria monocytogenes*. 13(11), 602–609. 4

Dygico, L. K., Gahan, C. G. M., Grogan, H., & Burgess, C. M. (2020). *Examining the efficacy of mushroom industry biocides on Listeria monocytogenes biofilm*.

Erickson, B., Fang, M., Wallace, J. M., & Liers, C. (2013). *Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms*. 8(January).

Fagerlund, A., Heir, E., Møretrø, T., & Langsrud, S. (2020). *Listeria monocytogenes Biofilm Removal Using Different Commercial Cleaning Agents*.

Food, E., & Authority, S. (2021). *The European Union One Health 2019 Zoonoses Report*. 19(January)

Gallagher, D. L. (2003). *FSIS Risk Assessment for Listeria monocytogenes in DeliMeats*. May.

Helke, D. M., & Wong, A. M. Y. C. L. (1994). *Survival and Growth Characteristics of Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium on Stainless Steel and Buna-N Rubber*. 57(Ii), 963–968.

Herna, A., & Marti, L. (2003). *Spread of Bacterial Pathogens during Preparation of Freshly Squeezed Orange Juice*. 66(8), 1490–1494

Huang, H., Ren, H., Ding, L., Geng, J., Xu, K., & Zhang, Y. (2014).

Bioresource Technology Aging biofilm from a full-scale moving bed biofilm reactor: Characterization and enzymatic treatment study. 154, 122–130.

Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & 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.

Kusumaningrum. (2002). *Effects of Antibacterial Dishwashing Liquid on Foodborne Pathogens and Competitive Microorganisms in Kitchen Sponges*. 65(1), 61–65.

Lawrence, L. M., & Gilmour, A. (1994). *Incidence of Listeria spp. and Listeria monocytogenes in a Poultry Processing Environment and in Poultry Products and Their Rapid Confirmation by Multiplex PCR*. 60(12), 4600–4604.

Leal, F., & Rocío, A. (2019). *Evaluación de la detergencia de suciedad mixta (grasa y almidón) adherida a superficies de acero inoxidable en la industria alimentaria*.

Lewis, K. I. M. (2001). *Minireview: Riddle of Biofilm Resistance*. 45(4), 999–1007.

Lomonaco, S., Nucera, D., & Filipello, V. (2015). Infection, Genetics and Evolution the evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, genetics and evolution*, 35, 172–183.

Mazaheri, T., & Hascoët, A. S. (2020). Effect of an enzymatic treatment on the removal of mature *Listeria monocytogenes* biofilms: A quantitative and qualitative study. *Food Control*, 114(March), 107266.

Montañez-Izquierdo, V. (2013). *Métodos convencionales, rápidos y alternativos para el control microbiológico de la higiene en superficies*. Universidad Autónoma de Barcelona. Mustapha, A., & Liewen, M. B. (1989). *Destruction of Listeria monocytogenes by Sodium Hypochlorite and Quaternary Ammonium Sanitizers*. 52(5), 306–311

Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E., & Simões, M. (2016). The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *FRIN*, 86, 140–146.

Mustapha, A., & Liewen, M. B. (1989). *Destruction of Listeria monocytogenes by Sodium Hypochlorite and Quaternary Ammonium Sanitizers*. 52(5), 306–311.

Nahar, S. (2018). *Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry*. 17, 1484–1502.

Ortiz, S., López, V., & Martínez-suárez, J. V. (2014). 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., Villatoro, D., López, P., Dávila, J. C., & 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.

Ortiz, S., López-alonso, V., & Rodríguez, P. (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(23), 308–317

Ortiz, S., López, V., & Martínez-suárez, J. V. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride-resistant strains. *Food Microbiology*, 39, 81–88.

Puga, C. H., Rodríguez-lópez, P., Cabo, M. L., Sanjose, C., & Orgaz, B. (2018). Enzymatic dispersal of dual-species biofilms carrying *Listeria monocytogenes* and other associated food industry bacteria. *Food Control*, 94(April), 222–228

Publishing, I. W. A. (2017). *Effect of sodium hypochlorite on typical biofilms formed in drinking water distribution systems* Huirong Lin, Xuan Zhu, Yuxin Wang and Xin Yu. 218–227.

Ripolles-Avila, C. (2018). *Supervivencia de Listeria Monocytogenes sobre superficies de contacto con alimentos: Un abordaje multidisciplinar de un problema complejo (Tesis doctoral)*. Universidad Autónoma de Barcelona.

Ripolles-Avila, C., Ramos-Rubio, M., Hascoët, A. S., Castillo, M., y Rodríguez-Jerez, J. J. (2020). International Journal of Food Microbiology New approach for the removal of mature biofilms formed by wild strains of *Listeria monocytogenes* isolated from food contact surfaces in an Iberian pig processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 323(February), 108595

Shamsun Naha. (2018). Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. *Food Science and Food Safety*, 17, 1484–1502

Sharma, M., Ryu, J. H., & Beuchat, L. R. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 449–459.

Salas (2019). Confesiones de una bacteria atrapa en un biofilm. Connecting Waterpeople.

Shen, H., & Chou, K. (2007). *EzyPred: A top – down approach for predicting enzyme functional classes and subclasses*. 364, 53–59.

Silva, N. A., & Teixeira, P. (2008). *Adhesion to and Viability of Listeria monocytogenes on AND*. 71(7), 1379–1385.

Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. (2013). Bio film formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585.

Tang, X., Flint, S. H., Bennett, R. J., & Brooks, J. D. (2010). The efficacy of different cleaners and sanitizers in cleaning biofilms on UF membranes used in the dairy industry. *Water, B. W., & Hung, Y. (2014). Original article the effect of organic loads on stability of various chlorine-based sanitizers*. 867–875

Wilks, S. A., Michels, H. T., & Keevil, C. W. (2006). *Survival of Listeria monocytogenes Scott A on metal surfaces: Implications for cross-contamination of Membrane Science*, 111, 93–98., 352(1–2), 71–75.

Wingender, J., & Neu, T. R. (1999). *What is Bacterial Extracellular Polymeric Substances?*

Wong, A. C. L. (1998). Biofilms in Food Processing Environments. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2765–2770.

Zhu, M. (2019). *Comparative Evaluation of Different Sanitizers Against Listeria Monocytogenes Biofilms on Major Food-Contact Surfaces*. 10(November), 1–8

