



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Desarrollo de biofilms de *Listeria monocytogenes* y microbiota
acompañante en instalaciones cárnicas: cuantificación, acción sinérgica y
antagonista**

Anne-Sophie Hascoët

Tesis Doctoral

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

Para optar al grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos

Trabajo dirigido por el Dr. José Juan Rodríguez Jerez y la Dra. Carolina Ripollés Ávila

Facultad de Veterinaria

Bellaterra, junio de 2019

El Dr. JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ, profesor titular y la Dra. CAROLINA RIPOLLÉS ÁVILA, profesora asociada del área de nutrición y bromatología del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*.

HACEN CONSTAR:

Que la memoria titulada “**Desarrollo de biofilms de *Listeria monocytogenes* y microbiota acompañante en instalaciones cárnicas: cuantificación, acción sinérgica y antagonista**”, presentada por Anne-Sophie Hascoët para optar al grado de Doctor por la *Universitat Autònoma de Barcelona*, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Bellaterra, a día 12 de junio de 2019.

José Juan Rodríguez Jerez

Carolina Ripollés Ávila

AGRADECIMIENTOS

Para empezar, quiero agradecer especialmente al Dr. José Juan Rodríguez Jerez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por guiarme en todo este proceso, por su confianza, su optimismo inquebrantable, sus consejos, sus ánimos constantes durante todo el Doctorado y, también tengo que reconocerlo, por armarse de paciencia conmigo.

Mil gracias también a la Dra. Carolina Ripollés Ávila por enseñarme todo desde el primer día, por haberme acompañado y guiado en cada paso, por su generosidad, su apoyo, sus ánimos del primero hasta el último día, por darme la sensación de que soy capaz de mucho, por ser una persona tan inspiradora y por transmitir tan bien su pasión por la investigación.

Gracias a Josep Maria Gomà, Jordi Gomà y Carles Masvidal y a todo el equipo de Grupo PH-Albio por darme la oportunidad de progresar en otro ámbito profesional, por la confianza, por la flexibilidad otorgada desde el primer día, por el apoyo, los ánimos durante casi dos años y por la tremenda oportunidad que me están concediendo de cara al futuro.

Gracias a todo el equipo de la industria de procesado de cerdo ibérico por colaborar con nosotros durante todos estos años, por seguir abriendo sus puertas a más proyectos de investigación, por ser un ejemplo de progreso e innovación y por su interés por la ciencia.

Gracias a Alfons Guerrero Navarro por sus ingenios y por ayudarme desde el primer día, a Maria Martínez Garcia por todos los consejos, por contestar pacientemente a todas mis preguntas, por reflexionar conmigo el tiempo que hiciera falta sobre los experimentos y mucho más, a Brayan Cervantes Huaman, Tina Mazaheri y Jezer Saucedá Gálvez por vuestro apoyo y ayuda.

Gracias a Dolors por estar a la escucha de absolutamente todas nuestras penas y alegrías y por tener el laboratorio siempre en las mejores condiciones posibles.

Gracias a los compañeros de los Servicios Veterinarios Oficiales: Silvia, Emilio, Alba, Esther, Rosa, Nati, Amaya, Dani, Montse, Carme, Víctor, Josep, Jaume, Leandro, Ana por todo lo que me habéis enseñado, por la escucha y por hacer que las noches sean menos difíciles.

Gracias también a los profesores de la carrera: Manoli, M^a Angels Calvo por la escucha y por la ayuda cada vez que la he necesitado, a Josep Yuste y Marta Capellas por la tremenda

organización del Workshop cada año y, también, Marta, por la coordinación del programa de Doctorado.

Gracias a Juan Luis Fernández y a Josep-Maria Fàbregas, directores del Máster en Marketing farmacéutico de la Universidad Pompeu Fabra, por ser tan inspiradores y por, nada más presentarme, haberme animado a seguir con lo que me había propuesto profesionalmente.

Gracias a toda mi familia y amigos por el apoyo, por ser tan comprensivos al entender mi dedicación.

Gracias a Roberto por apoyarme en todo lo que me proponga, por acompañarme en mi vida día a día y por hacerme soñar con lo que está por venir.

El presente trabajo se engloba dentro del **Proyecto Nacional SURLIS (RTA2014-00045C03-03)**, un proyecto multidisciplinar enfocado hacia la lucha contra uno de los problemas más importantes relacionados con la contaminación de superficies industriales, como son los biofilms de *Listeria monocytogenes*, el patógeno con mayor porcentaje de mortalidad por transmisión alimentaria a nivel europeo.

Los resultados de la presente tesis doctoral se mantendrán confidenciales hasta haber obtenido la correspondiente protección por patente. Para ello, se encriptarán los nombres de los microorganismos de interés con las letras *B* y *R*.

RESUMEN

La inocuidad alimentaria tiene por objetivo garantizar la ausencia, o por lo menos, asegurar un nivel seguro y aceptable, de peligros en los alimentos que puedan perjudicar la salud de los consumidores. Los peligros transmitidos por los alimentos pueden ser de naturaleza microbiológica, química o física. La inocuidad tiene un papel fundamental para garantizar la seguridad de los alimentos en cada etapa de la cadena alimentaria, desde la producción hasta la cosecha, el procesado, el almacenado, la distribución, la preparación y el consumo. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, cada año, los alimentos insalubres causan pérdidas de producción de alrededor de 95.000 millones de dólares. Además, se añade actualmente una nueva problemática, la resistencia a los antimicrobianos, siendo una de las mayores amenazas para la salud mundial y la seguridad alimentaria.

Los alimentos pueden contaminarse por múltiples vías, pero una de ellas es por contaminación cruzada a partir de las superficies. Las industrias alimentarias se esfuerzan constantemente para minimizar la contaminación microbiana existente en las instalaciones. No obstante, muchos microorganismos son capaces de persistir a los protocolos establecidos de limpieza y desinfección mediante la formación de estructuras de resistencia denominadas biofilms. Estas comunidades de microorganismos, que constituyen la microbiota residente de las superficies, pueden tener un impacto sobre la persistencia de alterantes y patógenos de transmisión alimentaria. Entre ellos, *Listeria monocytogenes* es una de las bacterias más preocupantes dentro del sector alimentario. Aunque la listeriosis es rara, la enfermedad suele ser grave, con altas tasas de hospitalización y mortalidad.

Con el objetivo de aportar nuevas estrategias de control sobre este patógeno, se procedió, para empezar, al análisis de la microbiota presente en superficies de una planta de procesado de cerdo ibérico mediante la implementación de sensores SCH. Este estudio reveló la predominancia de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. Se relacionaron, además, los perfiles de microorganismos obtenidos con la presencia de *L. monocytogenes*, viéndose favorecida con perfiles predominantes en *Pseudomonas* spp. y enterobacterias.

Seguidamente, se realizó una serie de pruebas preliminares, efectuadas con las especies identificadas a partir del análisis de la microbiota de las plantas bajo estudio, para cribar la presencia de especies potencialmente interesantes. Se seleccionaron *B* y *R*, por su

comportamiento frente a *L. monocytogenes*, para probar el efecto de biofilms preformados de estos microorganismos sobre la implantación y la formación de biopelículas del patógeno.

Los biofilms maduros preestablecidos de *R*, aunque no favorecieron la presencia de *L. monocytogenes*, no ejercieron un efecto inhibitorio remarcable. Sin embargo, los biofilms de *B*, generados *in vitro*, inhibieron, significativamente, a múltiples cepas de *L. monocytogenes*, convirtiéndose en un microorganismo de gran interés para el biocontrol de este patógeno en superficies.

Por último, continuando con el desarrollo de una potencial nueva herramienta de lucha frente a *L. monocytogenes*, se efectuó una aproximación al entorno industrial, realizando una prueba en suelos de una planta piloto y en productos finales como salchichones y chorizos. En vista de los resultados obtenidos en la planta piloto, todavía se deben llevar a cabo más estudios y ajustar los protocolos de aplicación. Además, *B* ha resultado no ser un posible bioconservador de productos finales como salchichones y chorizos envasados al vacío. No obstante, los resultados del *challenge test* han demostrado que, tanto a nivel de inocuidad frente a *L. monocytogenes* como organolépticamente, es recomendable conservar estos embutidos frescos curados, envasados al vacío y no loncheados, a temperatura ambiente, en vez de mantenerlos en condiciones de refrigeración.

RESUM

La innocuïtat alimentària té per objectiu garantir l'absència, o com a mínim, assegurar un nivell segur i acceptable, de perills en els aliments que poden perjudicar la salut dels consumidors. Els perills transmesos pels aliments poden ser de naturalesa microbiològica, química o física. La innocuïtat té un paper fonamental per garantir la seguretat dels aliments en cada etapa de la cadena alimentària, des de la producció fins a la collita, el processat, l'emmagatzematge, la distribució, la preparació i el consum. Segons l'Organització per a l'Alimentació i l'Agricultura de les Nacions Unides, cada any, els aliments insalubres causen pèrdues de producció de aproximadament 95.000 milions de dòlars. A més, s'afegeix una nova problemàtica, la resistència als antimicrobians, una de les majors amenaces per a la salut mundial i la seguretat alimentària.

Els aliments es poden contaminar per múltiples vies, però una d'elles és per contaminació creuada a partir de les superfícies. Les indústries alimentàries s'esforcen constantment per minimitzar la contaminació microbiana existent en les instal·lacions. No obstant això, molts microorganismes són capaços de sobreviure als protocols de neteja i desinfecció mitjançant la formació d'estructures de resistència, anomenades biofilms. Aquestes comunitats de microorganismes, que representen la microbiota resident de les instal·lacions, poden tenir un impacte sobre la persistència d'alteradors i patògens de transmissió alimentària. Entre ells, *Listeria monocytogenes* és un dels bacteris més preocupants dins el sector alimentari. Tot i que és una infecció rara, la malaltia sol ser greu, amb elevades taxes d'hospitalització i mortalitat.

Amb l'objectiu d'aportar noves estratègies de control d'aquest patogen, es va procedir, per començar, a l'anàlisi de la microbiota present en les superfícies d'una planta de processat de porc ibèric mitjançant la implementació de sensors SCH. Aquest estudi va revelar la predominança de *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. Es van relacionar, a més, els perfils de microorganismes obtinguts amb la presència de *L. monocytogenes*, sent afavorida amb perfils dominats per *Pseudomonas* spp. i enterobacteris.

Seguidament, es va realitzar una sèrie de proves preliminars, efectuades amb les espècies identificades a partir de l'anàlisi de la microbiota de les instal·lacions sota estudi, per crivellar la presència d'espècies interessants. Es van seleccionar *B* i *R*, pel seu comportament en front a *L. monocytogenes*, i per provar l'efecte dels biofilms pre-formats d'aquests microorganismes sobre la implantació i la formació de biofilms del patogen.

Els biofilms madurs preestablerts de *R*, encara que no van afavorir la presència de *L. monocytogenes*, no van exercir un efecte inhibidor remarcable. No obstant això, els biofilms de *B*, generats *in vitro*, van inhibir significativament a múltiples soques de *L. monocytogenes*, convertint-se en un microorganisme de gran interès per al control biològic d'aquest patogen en superfícies.

Finalment, continuant amb el desenvolupament d'una potencial nova eina de lluita enfront *L. monocytogenes*, i aproximant-se a l'entorn industrial, es va realitzar una prova en una planta pilot i en productes finals com llonganisses i xoriços. Tenint en consideració els resultats obtinguts a la planta pilot, encara s'han de dur a terme més estudis i ajustar els protocols d'aplicació. A més, *B* ha resultat no ser un possible bioconservador de productes finals com llonganisses i xoriços envasats al buit. No obstant això, els resultats de la prova (*challenge test*) han demostrat que, tant a nivell d'innocuitat enfront de *L. monocytogenes* com organolèpticament, és recomanable conservar aquests embotits frescos curats, envasats al buit i no llescats, a temperatura ambient, en lloc de mantenir-los en condicions de refrigeració.

ABSTRACT

Food safety can be defined as the absence, or at least as safe and acceptable levels, of hazards in food that can affect health consumers. These food safety hazards can be classified as microbiological, chemical or physical. This concept plays a fundamental role in ensuring the safety of food at each stage of the food chain, from production to harvest, processing, storage, distribution, to preparation and consumption. According to the Food and Agriculture Organization, each year, the impact of unsafe food causes around of 95,000 million dollars of food losses. Moreover, there is a new problem, the resistance to antimicrobials, which is one of the greatest threats to global health and food safety.

Food can be contaminated by multiple ways, but one of them is by cross-contamination from surfaces. The food industries are constantly striving to minimize microbial contamination in the facilities. However, many microorganisms can resist cleaning and disinfection protocols by forming resistance structures called biofilms. These communities of microorganisms, which are part of the resident microbiota, can have an impact on the persistence of spoilers and foodborne pathogens. Among them, *Listeria monocytogenes* is one of the most worrisome bacteria in the food sector. Although this infection is rare, this foodborne disease is usually serious, with high rates of hospitalization and mortality.

With the aim of providing new control strategies for this pathogen, an analysis of the microbiota present on the surfaces of an Iberian pig processing plant, was achieved, through the implementation of SCH sensors. This study revealed the predominance of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. The profiles of microorganisms were also related to the presence of *L. monocytogenes*, being favored when *Pseudomonas* spp. and enterobacteria were dominant.

Then, a series of preliminary tests were carried out with the species identified from the analysis of the microbiota of the processing plant under study, to screen the presence of interesting species. *B* and *R* were selected for their interaction with *L. monocytogenes*, and the effect of these preformed biofilms were tested on the implantation and formation of biofilms of *L. monocytogenes*.

The mature preformed biofilms of *R*, although they did not favor the presence of *L. monocytogenes*, did not exert a remarkable inhibitory effect. However, *B* biofilms, generated *in vitro*, inhibited, significantly, multiple strains of *L. monocytogenes*, becoming

subsequently a microorganism of great interest for the biological control of this pathogen on surfaces.

Finally, continuing with the development of a potential new tool against *L. monocytogenes*, and approaching the industrial environment, tests in a pilot plant and involving final products such as Iberian sausages were performed. Considering the results from the pilot plant, more studies are needed to adjust the application protocols. Furthermore, *B* cannot be a potential bioconservative of final products such as vacuum-packed sausages. However, the results of the challenge test have shown that, both in terms of safety against *L. monocytogenes* and organoleptically, it is advisable to maintain these vacuum packed and not sliced fresh cured sausages at room temperature instead of keeping them in refrigeration.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	7
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
1. Seguridad alimentaria	15
2. Enfermedades de transmisión alimentaria.....	16
3. Una problemática añadida: las resistencias a los antimicrobianos.....	20
3.1 Aparición y propagación de RAM.....	21
3.2 Soluciones y medidas a tomar	22
3.3 RAM en industrias alimentarias	24
4. Sector cárnico y su implicación en las ETAs	26
4.1 Magnitud del sector	26
4.2 La carne: vehículo de transmisión de patógenos.....	27
4.3 Reflexión sobre la situación del sector de producción cárnica.....	30
5. Biofilms	32
5.1 Definición	32
5.2 Biofilms mixtos	33
5.3 Proceso de formación	36
5.3.1 Unión reversible a la superficie.....	38
5.3.2 Unión irreversible.....	39
5.3.3 Formación de microcolonias	40
5.3.4 Maduración.....	41
5.3.5 Dispersión.....	41
5.4 Impacto de los biofilms y las contaminaciones cruzadas	42
6. Métodos para la detección y cuantificación de los biofilms.....	43
6.1 Detección y muestreo de superficies	43
6.2 Cuantificación.....	45
7. Eliminación de los biofilms.....	48
7.1 Tratamientos químicos	49
7.2 Enzimas	50

7.3 Biosurfactantes	51
7.4 Bacteriófagos	52
7.5 Bacteriocinas	53
7.6 Inhibición del <i>quorum sensing</i>	53
7.7 Aceites esenciales	54
7.8 Carga microbiana final después de los tratamientos de eliminación.....	54
8. Microbiota residente en industrias cárnicas	55
9. <i>Listeria monocytogenes</i>	60
9.1 Descripción.....	60
9.2 Incidencia de la listeriosis.....	61
9.3 Interacciones entre <i>L. monocytogenes</i> y otras especies bacterianas en biofilms mixtos	62
IV. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN SUPERFICIES DE UNA PLANTA DE PROCESADO DE CERDO IBÉRICO MEDIANTE LA IMPLEMENTACIÓN DE SENSORES SCH	67
1. Planteamiento inicial	69
2. Materiales y métodos.....	70
2.1 Planteamiento del estudio	70
2.2 Análisis microbiológico cuantitativo de las superficies de trabajo	74
2.3 Metodología para el aislamiento y la identificación.....	74
2.4 Análisis estadístico de los datos	75
3. Resultados y discusión	77
3.1 Especies identificadas.....	77
3.2 Perfiles de las superficies muestreadas en cuanto a bacterias aerobias mesófilas. 81	
3.2.1 Clúster 1: predominancia de <i>Pseudomonas</i> spp.	82
3.2.2 Clúster 2: predominancia de <i>Bacillus</i> spp.	85
3.2.3 Clústeres 3 y 4: otros perfiles	88
3.2.4 Identificación inhabitual de <i>Mannheimia haemolytica</i>	89
3.2.5 Perfil de las áreas en cuanto a BAL y levaduras identificadas.....	91

3.3 Influencia de la microbiota sobre la presencia de <i>L. monocytogenes</i>	93
4. Conclusión parcial	96
V. PRUEBAS PRELIMINARES PARA EL CRIBADO DE POSIBLES INHIBIDORES O POTENCIADORES DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> PRESENTES EN LA MICROBIOTA DE UNA PLANTA DE PROCESADO DE CERDO IBÉRICO	97
1. Planteamiento inicial	99
2. Materiales y métodos.....	100
2.1 Determinación del tipo de interacción entre las diferentes especies aisladas y <i>L. monocytogenes</i> en medio de cultivo sólido	100
2.2 Cultivos de <i>L. monocytogenes</i> con un extracto libre de células procedente de dos microorganismos con potencial anti- <i>Listeria</i>	100
2.3 Co-cultivos en medio líquido entre <i>L. monocytogenes</i> y dos microorganismos de interés	102
2.4 Análisis estadístico	104
3. Resultados y discusión	105
3.1 Patrones de interacción entre microorganismos	105
3.2 Interacciones observadas entre especies.....	106
3.3 Curva patrón entre unidades McFarland y UFC/ml de <i>B</i> y <i>R</i>	111
3.4 Cultivos de <i>L. monocytogenes</i> con un extracto libre de células de microorganismos con potencial anti- <i>Listeria</i>	112
3.5 Co-cultivos en medio líquido de <i>L. monocytogenes</i> con los mismos dos microorganismos	115
4. Conclusión parcial	123
VI. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BIOFILMS PREFORMADOS DE <i>B</i> Y <i>R</i> SOBRE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	125
1. Planteamiento inicial	127
2. Materiales y métodos.....	128
2.1 Comprobación de la capacidad para formar biofilms de <i>B</i> y <i>R</i>	128
2.1.1 Superficie de estudio	128

2.1.2 Preparación del inóculo	128
2.1.3 Formación de biofilms monoespecie <i>in vitro</i>	129
2.1.4 Evaluación de la formación de biofilms mediante DEM	129
2.2 Evaluación del efecto de los biofilms preformados de los dos microorganismos de interés sobre 22 cepas de <i>L. monocytogenes</i>	130
2.2.1 Cepas de <i>L. monocytogenes</i> empleadas.....	130
2.2.2 Preparación de los inóculos.....	131
2.2.3 Formación de biofilms monoespecie <i>in vitro</i> y posterior implantación de <i>L. monocytogenes</i> en la estructura.....	132
2.2.4 Cuantificación de biofilms mediante cultivo en agar ALOA, TEMPO y qPCR	132
2.3 Evaluación del efecto de los biofilms preformados de <i>Pseudomonas</i> spp. y <i>Candida zeylanoides</i> sobre <i>L. monocytogenes</i>	134
2.4 Caracterización del efecto de los biofilms preformados de <i>B</i> y <i>R</i> sobre <i>L. monocytogenes</i>	134
2.5 Análisis estadístico	135
3. Resultados y discusión	136
3.1 Evaluación de la capacidad para formar biofilms de <i>B</i> y <i>R</i>	136
3.2 Evaluación del efecto de los biofilms preformados de los dos microorganismos de interés sobre 22 cepas de <i>L. monocytogenes</i>	137
3.3 Evaluación del efecto de los biofilms preformados de <i>Pseudomonas</i> spp. y <i>Candida zeylanoides</i> sobre <i>L. monocytogenes</i>	143
3.4 Caracterización del efecto de los biofilms preformados de <i>B</i> y <i>R</i> sobre <i>L. monocytogenes</i>	146
4. Conclusión parcial	150
VII. BIOCONTROL DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN SUPERFICIES Y PRODUCTO FINAL: APROXIMACIÓN AL ENTORNO INDUSTRIAL.....	151
1. Planteamiento inicial	153
2. Materiales y métodos.....	154
2.1 Evaluación del efecto de biofilms preformados de <i>B</i> sobre una cepa no patogénica de <i>L. monocytogenes</i> en las superficies de una planta piloto	154
2.1.1 Superficies de estudio.....	154

2.1.2 Preparación del inóculo	154
2.1.3 Formación de biofilms en la planta piloto.....	155
2.1.4 Cuantificación de biofilms mediante cultivo tradicional y sistema TEMPO	157
2.2 Análisis del efecto de la presencia de <i>B</i> en salchichones y chorizos a nivel organoléptico, y sobre <i>L. monocytogenes</i> y otros indicadores microbianos (<i>challenge test</i>).....	158
2.2.1 Planteamiento del <i>challenge test</i>	158
2.2.2 Preparación de los inóculos.....	159
2.2.3 Cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> y otros indicadores microbianos.....	160
2.3 Análisis estadístico	160
3. Resultados y discusión	161
3.1 Efecto de los biofilms preformados de <i>B</i> sobre <i>L. monocytogenes</i> , no patogénica, en superficies de una planta piloto	161
3.1.1 Método de muestreo	161
3.1.2 Condiciones ambientales y otros factores	162
3.1.3 Biocontrol de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> en superficies	163
3.2 Efecto de la presencia de <i>B</i> en salchichones y chorizos a nivel organoléptico y sobre <i>L. monocytogenes</i> y otros indicadores microbianos (<i>challenge test</i>)	170
3.2.1 Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	171
3.2.2 Recuento de aerobios totales	172
3.2.3 Recuento de bacterias del ácido láctico.....	172
3.2.4 Recuento de levaduras.....	174
3.2.5 Evolución organoléptica de las muestras de salchichón y chorizo.....	178
4. Conclusión parcial	181
VIII. CONCLUSIONES.....	183
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	189
ANEXO.....	207

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

SCH: *Sensor Control Hygiene*.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

OMS o WHO: Organización Mundial de la Salud.

CE: Comisión Europea.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

ETA/s: enfermedad/es de transmisión alimentaria.

INFOSAN: Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos.

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades.

RAM: Resistencia/s a antimicrobianos.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

TGHR: transferencia horizontal de genes de resistencia.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

UE: Unión Europea.

PNIR: Plan Nacional de Investigación de Residuos.

PRAN: Plan Nacional Resistencia Antibióticos.

ESC: *E. coli* resistente a las cefalosporinas de amplio espectro.

CMI: concentración mínima inhibitoria.

STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga.

BLEE: bacterias productoras de betalactamasa/s de amplio espectro.

QAC: compuestos de amonio cuaternario.

PIB: Producto Interior Bruto.

AECOC: Asociación Española de Codificación Comercial.

ANICE: Asociación Nacional de las Industrias de la Carne de España.

CONSEBRO: Asociación de Industrias Agroalimentarias de Navarra, La Rioja y Aragón.

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control.

EPS: sustancias poliméricas extracelulares.

QS: *quorum sensing*.

NIH: *US National Health Institute*.

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention.*

UFC: unidad formadora de colonias.

ATP: trifosfato de adenosina.

AFNOR: Asociación Francesa de Normalización.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; y qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

MS: materia seca.

QCM: microbalanza de cristal de cuarzo.

TOC: equipo especializado que determina el carbono orgánico total.

AENOR: Asociación Española de Normalización y Certificación.

ClO₂: dióxido de cloro.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

sRNAs: *small RNAs* (ácido ribonucleico).

GOARN: Red Mundial de Alerta y Respuesta ante Brotes Epidémicos.

RTE: listo para consumo (*ready to eat*).

AI-2: señal auto-inductora 2.

BAL: bacterias del ácido láctico.

rRNA: ácido ribonucleico ribosómico.

Hz: Hertz.

ISO: Organización Internacional de Normalización.

PCA: *Plate Count Agar.*

MRS: *Man, Sharpe and Rose agar.*

TSA: *Tryptic Soy Agar.*

KOH: hidróxido de potasio.

ALOA: agar cromogénico para *Listeria monocytogenes.*

Lm: *Listeria monocytogenes.*

TSB: *Tryptic Soy Broth.*

NaCl: cloruro sódico.

Ct: umbral de ciclo, corresponde al número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base.

ANOVA: análisis de variancia.

m.o: microorganismo.

BHI: *Brain Heart infusion agar*.

P: p-valor.

ACOFESAL: Asociación de Consultores y Formadores de España en Calidad y Seguridad Alimentaria.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales agentes causantes de ETAs según el informe “Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria: estimaciones de la OMS”, modificado de WHO (2015).	17
Tabla 2. Múltiples y diversos ejemplos de RAM observadas en el ámbito alimentario de 2016-2018. Elaboración propia.	24
Tabla 3. Estudios de los años 2017-2018 que han detectado la presencia de patógenos en canales, muestras de carne, fecales o ambientales. Se indican los porcentajes de muestras positivas a la presencia del patógeno correspondiente. Elaboración propia.....	29
Tabla 4. Ejemplos de biofilms mixtos generados <i>in vitro</i> y sus características versus los biofilms monoespecie de las especies correspondientes. Elaboración propia.....	35
Tabla 5. Principales métodos disponibles para la cuantificación de los biofilms tanto para hacer el seguimiento del estado higiénico de las superficies de una industria alimentaria como para cuantificar biofilms generados <i>in vitro</i> . Elaboración propia.	45
Tabla 6. Métodos alternativos para cuantificar biofilms. Extraído y modificado de Wilson et al. (2017).....	47
Tabla 7. Microbiota residente en industrias cárnicas. Modificado de Møretro y Langsrud (2017).	56
Tabla 8. Interacciones entre <i>L. monocytogenes</i> (Lm) y otras especies bacterianas. Modificado de Giaouris et al. (2015).....	63
Tabla 9. Descripción de los puntos de las superficies donde se colocaron los sensores SCH, de la planta A y B (codificados de 1 a 13) (Ripolles-Avila, 2018).	70
Tabla 10. Géneros y especies identificadas a partir de cultivos en PCA. También se indica si son bacterias Gram positivas o negativas.	77
Tabla 11. Bacterias del ácido láctico identificadas a partir de cultivos en MRS.....	78
Tabla 12. Levaduras identificadas a partir de cultivos en PCA.....	78
Tabla 13. Serotipo y ubicación de los 5 aislados de <i>L. monocytogenes</i> obtenidos durante el macro estudio. Contenido extraído de Ripolles-Avila et al. (2019).	94
Tabla 14. Composición de las 12 combinaciones probadas.	104
Tabla 15. Matriz de resultados de las interacciones entre 4 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> y 43 especies diferentes (m.o pertenecientes a la microbiota aislada de una industria cárnica).	107

Tabla 16. Codificación y serotipos de las 22 cepas empleadas en este estudio (Ripolles-Avila, 2018).....	130
Tabla 17. Codificación de los grupos experimentales del estudio en la planta piloto.....	156
Tabla 18. Codificación de los grupos experimentales definidos en el <i>challenge test</i>	158

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del plan de trabajo de la presente tesis doctoral.	11
Figura 2. Tendencias de aparición de los brotes de transmisión alimentaria de 2008 a 2016 a partir de los datos proporcionados por EFSA y ECDC (2017). Elaboración propia.	19
Figura 3. Ejemplo evidente y frecuente de contaminación cruzada y de la falta de formación y concienciación de personas que manipulan alimentos: al colocar los pollos crudos encima de otros casi listos para servir, los jugos de los pollos sin cocer contaminan la carne de los más cocidos. Bruno Benier (n.d), Poulets rôtis entraînent de cuire au marché, fotografía con licencia de Adobe Stock.	30
Figura 4. Interacciones complejas entre factores que afectan al proceso de formación, arquitectura y comportamiento de los biofilms. Modificado a partir de Whitehead y Verran, 2015.	37
Figura 5. Representación de las diferentes etapas de formación de biofilms multiespecie. Las fotografías en la parte inferior obtenidas por microscopía de epifluorescencia directa corresponden a cada una de las cinco fases de desarrollo de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> . Modificado de Ripolles-Avila (2018).	38
Figura 6. Base con los sensores SCH correspondientes (d) y ejemplos de su colocación en la industria colaboradora. Modificado de Ripolles-Avila (2018), siendo (a) el suelo del lavadero de los carros de fresco; (b) la mesa de loncheado; y (c) el lateral de la envasadora al vacío.	71
Figura 7. Diagrama de las principales salas y sensores SCH implantados para el estudio de la planta A y B. Modificado de Ortiz et al. (2010).	73
Figura 8. Análisis por clústeres jerárquicos mostrando el grado de similitud del perfil ecológico de las áreas muestreadas. Se aprecian 2 clústeres principales: uno agrupando las zonas 3, 4, 5, 13, 9, 1; y otro con las áreas 6, 7, 10.	82
Figura 9. Perfiles individuales de las áreas categorizadas como clúster 1. Nótese la predominancia de <i>Pseudomonas</i> spp. en la mayoría de las zonas y notable presencia de <i>Aeromonas</i> spp.	84
Figura 10. Fragmento de la Figura 7, sobre instalaciones y flujos correspondientes.	86
Figura 11. Perfiles individuales de las áreas categorizadas como clúster 2. Nótese la predominancia de <i>Bacillus</i> spp. en todas las zonas y la marcada presencia de <i>R</i> y <i>Enterobacter asburiae</i>	86

Figura 12. Perfiles individuales de las áreas categorizadas, cada una de ellas, como clúster 3, punto (8), y 4, punto (2).....	89
Figura 13. Perfil de las zonas en las que se identificaron especies de BAL.....	91
Figura 14. Perfil de las zonas en las que se identificaron especies de levaduras.	93
Figura 15. Principales etapas del experimento. Modificado del Póster presentado en el XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición “Alimentación 5S” en 2018.	102
Figura 16. a) Zona de interés en la que se produce la interacción entre ambas especies. En este caso, se consideraría una interacción neutra sin potenciación o inhibición del crecimiento de ninguna de las 2 especies confrontadas; b y c) mayor crecimiento de una de las 2 especies; d) mayor crecimiento de ambas especies; e) y f) una especie crece de igual forma que su control y la otra no crece o de forma menos intensa que su control respectivo.	105
Figura 17. Fotografías de algunas de las cruces obtenidas en agar TSA.	107
Figura 18. Resultado de las interacciones entre Lm 4 y B y Lm 4 y R.	109
Figura 19. Resultados de la curva patrón entre turbidez en unidades McFarland y recuento en UFC/ml de B y R.	111
Figura 20. Evolución de la absorbancia de un cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> junto con un extracto de B libre de células a diferentes concentraciones (a 10, 20, 30, 40 %) mediante Bioscreen C: a) cepa 2; b) cepa 3, de Lm.	113
Figura 21. Evolución de la absorbancia de un cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> junto con un extracto de R libre de células de diferentes concentraciones (a 10, 20, 30, 40%) mediante Bioscreen C: a) cepa 3; b) cepa 4, de Lm.	114
Figura 22. Recuentos de las diferentes cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> en las diferentes combinaciones (1-12, codificadas en la Tabla 14) de co-cultivos con sus respectivos controles tanto del patógeno como de B y R.	120
Figura 23. Ejemplos de fotografías de los biofilms formados a una semana de incubación por a) B y b) R, observados con tinción Live-Dead BacLight mediante microscopía de epifluorescencia directa (objetivo de 20x).....	136
Figura 24. Recuento de las células que conformaron los biofilms de las 22 cepas de <i>L. monocytogenes</i> control y mixtos: a) a los 2 días; y b) a los 7 días de incubación con B...	138
Figura 25. Recuento de las células que conformaron los biofilms de las 22 cepas de <i>L. monocytogenes</i> control y mixtos: a) a los 2 días; y b) a los 7 días de incubación con R...	141

Figura 26. Recuentos de las células que conformaron los biofilms control y mixtos de <i>L. monocytogenes</i> con: a) <i>C. zeylanoides</i> , b) <i>P. luteola</i> , c) <i>P. fluorescens</i> ; tras los 2 y 7 días de incubación.....	145
Figura 27. Recuentos de las células que conformaron los biofilms control y mixtos de <i>L. monocytogenes</i> con: a) <i>B</i> , b) <i>R</i> ; tras los 2 y 7 días de incubación	148
Figura 28. Fotografías del experimento en las que se observan las áreas de estudio: a) marcadas en el propio suelo de las instalaciones; y b) las placas de acero inoxidable, posicionadas a proximidad de un sumidero.....	156
Figura 29. Muestra de chorizo del grupo experimental A, inoculada en 5 áreas.	159
Figura 30. Recuento en log (UFC/cm ²) de a) <i>L. monocytogenes</i> y <i>B</i> ; b) aerobios totales; y c) levaduras en los diferentes grupos experimentales.	166
Figura 31. Recuento a partir de las muestras de salchichón de: a) <i>L. monocytogenes</i> ; b) aerobios totales; c) bacterias del ácido láctico; y d) levaduras.....	176
Figura 32. Recuento a partir de las muestras de chorizo de: a) <i>L. monocytogenes</i> ; b) aerobios totales; c) bacterias del ácido láctico; y d) levaduras..	178

I. INTRODUCCIÓN

A pesar de todos los esfuerzos realizados para eliminar los microorganismos presentes en las superficies de las industrias alimentarias mediante procedimientos de limpieza y desinfección, ciertas comunidades microbianas pueden persistir formando lo que se conoce como la microbiota residente. Ésta, inevitablemente, se encuentra en constante interacción con muchas otras especies microbianas transitorias, pudiendo influir en la supervivencia, colonización y formación de biofilms de microorganismos patógenos o alterantes (Agustín y Brugnoli, 2018). Por ello, conocer la composición microbiana residual en estas superficies es crucial para entender el efecto que puede conllevar en el deterioro o inocuidad de los productos alimenticios (Maes et al., 2019).

Existen medidas que permiten limitar la persistencia de estos microorganismos. Son un ejemplo el adecuado uso del agua, las bajas temperaturas en las instalaciones y los frecuentes procesos de limpieza y desinfección (Fratamico et al., 2009). No obstante, estos procedimientos no consiguen eliminar por completo la totalidad de los microorganismos presentes en las superficies, lo que puede implicar fenómenos de biotransferencia. Múltiples estudios muestran, de hecho, la capacidad de transferencia de microorganismos entre alimentos y superficies, manos, utensilios, entre otros, y destacan el papel relevante de la contaminación cruzada en las enfermedades de transmisión alimentaria (Dantas et al., 2018; Dourou et al., 2011; Grove et al., 2015; Jensen et al., 2017; Kim et al., 2014; Sauders y D'Amico, 2016). En este sentido, la desinfección no tiene como objetivo esterilizar las superficies, sino reducir su contaminación microbiana hasta alcanzar un nivel seguro y adecuado para su uso (Fratamico et al., 2009). Por esta razón, se puede asumir que, en la mayoría de los casos, se encontrarán aun así microorganismos presentes en las superficies.

Se ha detectado una amplia variedad de familias y géneros de microorganismos, así como una elevada variabilidad en términos de resultados obtenidos en estudios ecológicos, ya que influyen diferentes factores como la naturaleza del producto trabajado, las condiciones ambientales, entre otros. Sin embargo, se puede afirmar que, generalmente, en las superficies de las instalaciones alimentarias, domina *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. y bacterias del ácido láctico (Fagerlund et al., 2017; Møretro y Langsrud, 2017). Los microorganismos persistentes pueden terminar en los productos finales a través de la contaminación cruzada y desencadenar diferentes efectos, incluyendo desde la alteración de los mismos, hasta comprometer su inocuidad.

Estas especies residentes pueden inhibir la adhesión y proliferación de patógenos o, por el contrario, favorecer su implantación y desarrollo en forma de biofilms mixtos (Giaouris et al., 2015). La mayoría de los microorganismos, incluyendo inherentemente a patógenos y alterantes, tienen la capacidad de adherirse a las superficies industriales y desencadenar posteriormente la formación de biofilms (Parsek y Singh, 2003). Se destaca, entre ellos, a *L. monocytogenes* por ser un patógeno que actualmente presenta un riesgo relevante para la salud pública (EFSA y ECDC, 2018). La microbiota residente puede tener un fuerte efecto sobre la probabilidad de encontrar *L. monocytogenes* en las instalaciones alimentarias (Carpentier y Chassaing, 2004). Este patógeno, capaz de resistir a los protocolos de limpieza y desinfección, sigue siendo uno de los retos más importantes de salud pública para muchas industrias alimentarias, incluidas las del sector cárnico (Møretrø et al., 2013). Ortiz et al. (2010) revelaron, por ejemplo, la persistencia de distintas cepas de este patógeno durante 3 años en una misma industria. Por otro lado, es importante tener en cuenta que las bacterias residentes pueden desempeñar un papel en la permanencia y propagación de genes de resistencia a los antimicrobianos (Verraes et al., 2013). Por estos motivos, es esencial avanzar en la identificación de las bacterias subsistentes en los entornos de procesado de alimentos.

Hasta ahora, el enfoque propuesto para el control microbiológico de las superficies de contacto con los alimentos ha consistido en la máxima reducción de la carga microbiana. De acuerdo con ello, ha sido necesario diseñar productos y estrategias para maximizar las operaciones de limpieza y desinfección. Sin embargo, una estrategia interesante sería el uso de microorganismos que tienen la capacidad de competir con patógenos de transmisión alimentaria y, por lo tanto, evitar su crecimiento. Un estudio reciente ha propuesto que la teoría higiénica de las superficies tradicionalmente empleada por la industria alimentaria podría reconsiderarse mediante el uso de este tipo de microorganismos, siempre que no muestren ningún tipo de efecto de deterioro en los productos alimenticios (Ripolles-Avila et al., 2019). La problemática actual de las resistencias a los antimicrobianos (*sensu lato*) como los antibióticos y desinfectantes, pone de manifiesto la necesidad de buscar alternativas. Las bacterias del ácido láctico han despertado mucho interés como agente de biocontrol en superficies, envases y como bioconservadores en los propios alimentos, no obstante, existen otros géneros de interés y naturalmente presentes en las superficies de las industrias alimentarias. La búsqueda, pues, de especies pertenecientes a la microbiota residente de las

industrias alimentarias supone, no sólo una alternativa ecológica interesante a explorar, sino que abre un campo de estudio con mucha perspectiva de futuro.

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Los objetivos generales de la presente tesis doctoral fueron:

1. El análisis de la microbiota residente en las superficies de una industria cárnica.
2. La evaluación de las interacciones entre la microbiota residente y *L. monocytogenes*.
3. La identificación de posibles antagonistas o potenciadores de *L. monocytogenes* y la valoración de su aplicabilidad como método de control complementario de este patógeno.

Los objetivos específicos fueron:

- a. Realizar un estudio ecológico de la microbiota presente en las superficies de dos plantas de procesado de cerdo ibérico mediante el muestreo con sensores SCH.
- b. Identificar a los microorganismos residentes después de los procesos de limpieza y desinfección.
- c. Clasificar a los microorganismos identificados en función de su dominancia.
- d. Comparar el perfil microbiológico de las áreas en las que detectó presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en relación al histórico de las instalaciones.
- e. Investigar la presencia de posibles inhibidores o potenciadores de *L. monocytogenes*, a partir de la propia microbiota de la industria.
- f. Determinar el tipo de interacción ejercida por determinadas especies, pertenecientes a la microbiota residente, en cultivos con *L. monocytogenes*.
- g. Observar la capacidad de formación de biofilms de los microorganismos de interés mediante microscopía de epifluorescencia directa.
- h. Valorar el efecto de éstos sobre la implantación y desarrollo de biofilms de *L. monocytogenes*.
- i. Validar el protocolo de desarrollo de biofilms e implantación de *L. monocytogenes* con otros microorganismos dominantes.
- j. Comprobar la viabilidad de los posibles inhibidores como herramienta futura de biocontrol de *L. monocytogenes* en superficies y productos cárnicos.

Para alcanzar estos objetivos específicos, se plantearon los siguientes estudios experimentales:

1. Análisis de la microbiota presente en superficies de una planta de procesado de cerdo ibérico mediante la implementación de sensores SCH.
2. Realización de pruebas preliminares para el cribado de posibles inhibidores o potenciadores de *Listeria monocytogenes* presentes en la microbiota de una planta de procesado de cerdo ibérico.
3. Evaluación del efecto de biofilms preformados de *B* y *R* sobre *Listeria monocytogenes*.
4. Valoración de *B* como estrategia de biocontrol de *Listeria monocytogenes* en superficies y producto final: aproximación al entorno industrial.

En la **Figura 1** se muestra el plan de trabajo realizado para la presente tesis doctoral.

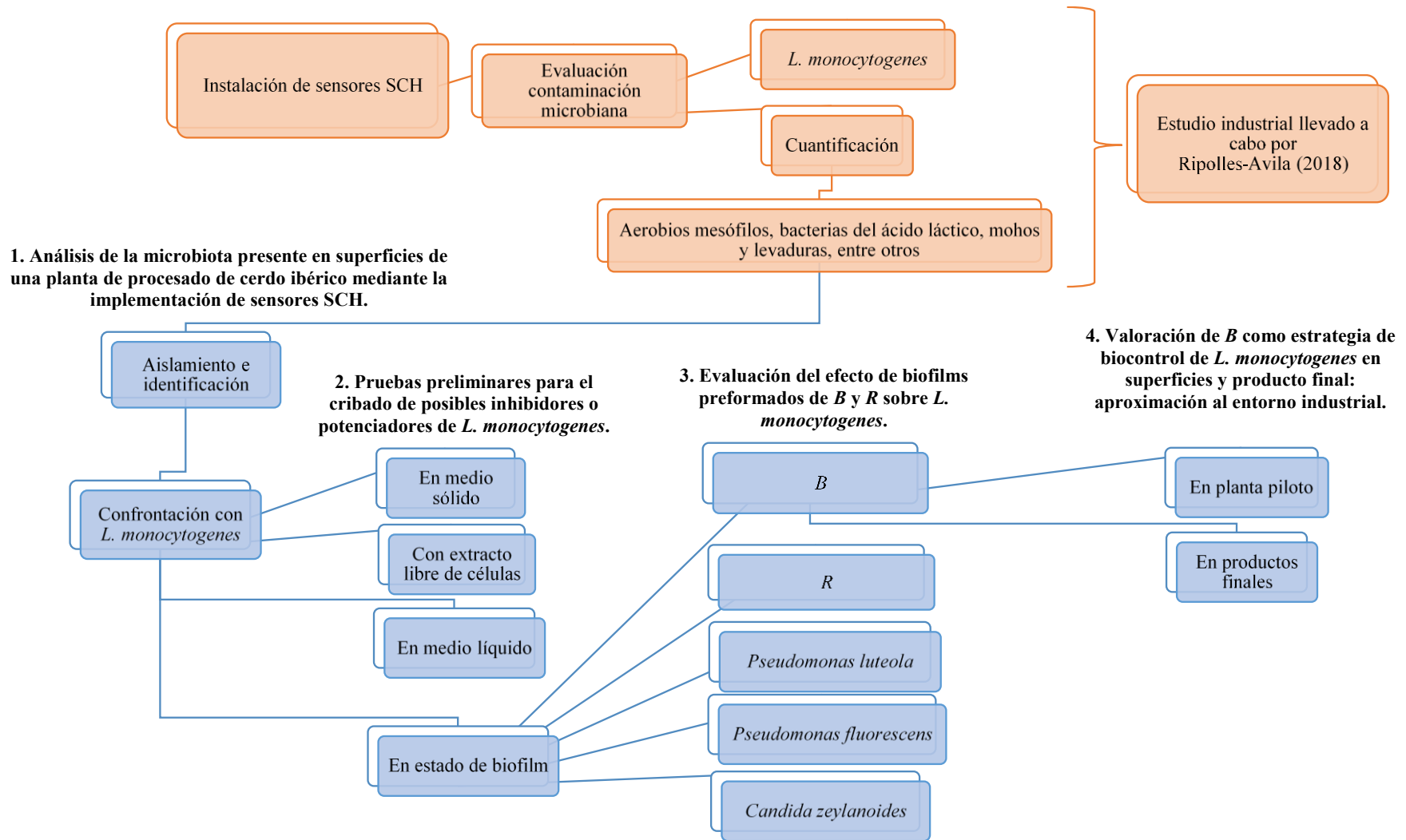


Figura 1. Esquema del plan de trabajo de la presente tesis doctoral.
 Figura 1. Esquema del plan de trabajo de la presente tesis doctoral.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria es un concepto flexible, como manifiestan los numerosos intentos por definirlo. Veinte años atrás se podían encontrar alrededor de 200 definiciones en escritos publicados. En la Cumbre Mundial de la Alimentación de 1996, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) afirmó que “*la seguridad alimentaria, a nivel de individuo, hogar, nación y global, se consigue cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana*” (FAO, n.d.; Ministerio de Medio Ambiente, 2010). Esta última es la definición más aceptada de seguridad alimentaria. Asimismo, y desde hace unos 25 años, ésta se ha concebido como una cuestión de responsabilidad internacional y nacional (FAO, n.d.).

La seguridad alimentaria abarca, entonces, cuatro conceptos (FAO, 2006; Ministerio de Medio Ambiente, 2010):

- i) Disponibilidad de alimentos: corresponde al recurso de alimentos en suficiente cantidad y siendo estos últimos de calidad apropiada, suministrados mediante producción nacional o importaciones (incluida la ayuda alimentaria).
- ii) Accesibilidad a los alimentos: definido por el acceso de los individuos a recursos aptos para adquirir alimentos adecuados y conseguir así una dieta nutritiva.
- iii) Utilización: se refiere al uso de alimentos a través de una dieta apropiada, agua potable, higiene y atención médica, para alcanzar un estado de bienestar nutricional en el que se satisfacen todas las necesidades fisiológicas.
- iv) Estabilidad: para garantizar la seguridad alimentaria, una población, hogar o individuo debe tener acceso a alimentos convenientes en todo momento. No debe existir el riesgo a perder este recurso, debido a posibles crisis repentinas (por ejemplo, crisis económica o climática) o eventos cíclicos, como podrían ser la inseguridad alimentaria estacional. Este concepto de estabilidad se refiere, por lo tanto, a las dimensiones de disponibilidad y acceso de la seguridad alimentaria de forma constante en el tiempo.

El término “seguridad alimentaria” también se emplea frecuentemente para hacer referencia a la inocuidad de los alimentos, no obstante, son conceptos distintos: “*no hay seguridad alimentaria sin inocuidad alimentaria*” (Graziano Da Silva, 2019). De hecho, la inocuidad

se podría definir como “todas las medidas encaminadas a garantizar que los alimentos no causen daño al consumidor si se preparan y/o ingieren según el uso al que están destinados” (Organización Mundial de la Salud, 2007).

Las enfermedades transmitidas a través de los alimentos suponen una importante carga para la salud. Millones de personas enferman y muchas otras mueren por ingerir alimentos insalubres. Los Estados Miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO en inglés), seriamente preocupados, adoptaron en el año 2000 una resolución en la cual se reconocía el papel fundamental de la inocuidad alimentaria para la salud pública. Por todo ello, existen múltiples instituciones y organismos, tanto a nivel internacional como nacional, que tienen por objetivo garantizar la seguridad alimentaria, inocuidad de los productos que se consumen, prevenir enfermedades y controlar el comercio entre países e interior. Encontramos entre ellos la OMS, la Comisión Europea (CE), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el *Codex Alimentarius* y la FAO (FAO, 1991; OMS, 2019; Unión Europea, 2017).

2. Enfermedades de transmisión alimentaria

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) son aquellas alteraciones del estado de salud, de naturaleza infecciosa (causada por microorganismos) o tóxica (por sustancias químicas) ocasionadas por agentes que penetran en el cuerpo a través de la ingesta de alimentos (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2016; OMS, 2019). Las ETAs comprenden un amplio espectro de afecciones y representan un problema de salud pública creciente en todo el mundo. La contaminación de los alimentos por estos agentes puede ocurrir en cualquier etapa del proceso, que va desde la producción, al consumo de los mismos (es decir, “*de la granja a la mesa*”) y puede deberse también a la contaminación ambiental, a través del agua, la tierra o el aire (OMS, 2019).

Cada año, en los países industrializados, hasta el 30 % de las personas padecen una toxiinfección alimentaria (WHO, 2007). En este sentido, las ETAs constituyen tanto una causa significativa de morbilidad y mortalidad, como un importante obstáculo al desarrollo socioeconómico en todo el mundo. En 2010, 31 agentes alimentarios, incluyendo bacterias, virus, protozoos, helmintos y productos químicos, causaron aproximadamente 600 millones de casos de ETAs y 420.000 muertes, un tercio de ellas asociadas a niños. La manifestación

clínica más común de una ETA radica en la aparición de síntomas gastrointestinales. La diarrea es, de hecho, el síntoma agudo más frecuente de las ETAs. Las enfermedades diarreicas representan la mitad de la carga mundial de las ETAs, 550 millones de personas enferman y 230.000 mueren cada año. De ellas, 220 millones son menores de 5 años y 96.000 mueren. Además, las ETAs pueden dar lugar a consecuencias graves como son la insuficiencia renal y hepática, los trastornos cerebrales y neurales, la artritis reactiva o el cáncer.

Las causas más frecuentes de ETAs son los agentes etiológicos de enfermedades diarreicas, especialmente norovirus y *Campylobacter* spp. Se registraron unas 230.000 muertes debido a ETAs diarreicas, destacando en este caso *Salmonella enterica* no tifoidea, que además de diarrea también causa enfermedad sistémica y *Escherichia coli* enteropatógena. Otras causas importantes de mortalidad por transmisión alimentaria son *Salmonella enterica* ser. Typhi, *Taenia solium*, el virus de la hepatitis A y las aflatoxinas (WHO, 2015).

Se presentan a continuación los principales agentes etiológicos de ETAs a nivel internacional según la OMS (Tabla 1).

Tabla 1. Principales agentes causantes de ETAs según el informe “Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria: estimaciones de la OMS”, modificado de WHO (2015).

Agentes causantes de ETAs		Descripción
Bacterias	<i>Listeria monocytogenes</i>	Puede provocar bacteriemia y meningitis, y suele propagarse por el consumo de hortalizas crudas, alimentos listos para el consumo, carnes procesadas, pescado ahumado o quesos blandos contaminados.
	<i>Brucella abortus</i>	Suele transmitirse a través de la leche no pasteurizada o el queso fabricado con leche de cabras u ovejas infectadas. Puede provocar fiebre, dolor muscular, artritis grave, fatiga crónica, síntomas neurológicos y depresión.
	<i>Vibrio cholerae</i>	Causa diarrea acuosa que puede ser mortal en pocas horas si no se trata.
Virus	Virus de la hepatitis A	Se transmite por alimentos contaminados por heces de personas infectadas. Causa ictericia, náuseas, anorexia, fiebre, malestar y dolor abdominal.
Parásitos	<i>Toxoplasma gondi</i>	La toxoplasmosis se transmite a través de carne poco cocinada o cruda y productos frescos. Produce pérdida de visión y afecciones neurológicas.
	<i>Taenia solium</i> (tenia del cerdo)	Puede provocar quistes en el cerebro (cisticercosis), que es la causa prevenible de epilepsia más frecuente en todo el mundo.
	<i>Echinococcus</i>	Puede infectar a humanos a través de alimentos contaminados por heces de perro o zorro y provocar la formación de quistes en el hígado, los pulmones y el cerebro.
	<i>Clonorchis sinensis</i> (trematodo de Asia Oriental)	Se suele contraer por el consumo de pescado crudo o incorrectamente procesado o cocinado y puede provocar inflamación y cáncer en los conductos biliares.

Productos químicos y toxinas	Aflatoxinas	Producida por un moho, en especial, <i>Aspergillus</i> spp. que crece en el grano almacenado inadecuadamente y puede provocar cáncer hepático.
	Cianuro	Puede estar presente en la yuca (mandioca) procesada inadecuadamente.

*Nótese que *L. monocytogenes* aparece como uno de los principales agentes causales de ETAs.

Pese a la deficiencia de datos y a las limitaciones de las estimaciones mencionadas anteriormente, queda de manifiesto que las ETAs representan uno de los principales problemas mundiales de salud pública. Afectan a personas de todas las edades, aunque sobre todo a menores de cinco años y a quienes viven en regiones del mundo con bajos ingresos (OMS, 2015; WHO, 2015). No obstante, la creciente globalización de los intercambios comerciales de productos alimentarios hace que aumente el riesgo de que puedan distribuirse rápidamente alimentos contaminados por todo el planeta. Por medio de la Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN), la OMS ayuda a los Estados Miembros a gestionar los riesgos relacionados con la inocuidad alimentaria, garantizando así el intercambio rápido de información en caso de emergencias. Por una parte, la red impide que los alimentos contaminados se dispersen por múltiples países. Por otra parte, INFOSAN facilita el intercambio de experiencias y soluciones de eficacia comprobada entre los distintos Estados, así como dentro de ellos, para optimizar las intervenciones futuras destinadas a proteger la salud de los consumidores.

“*Las ETAs son prevenibles, todos podemos contribuir*”, todas las partes interesadas pueden contribuir a mejorar la inocuidad de los alimentos en toda la cadena alimentaria mediante la formulación de políticas adecuadas a nivel nacional, regional e internacional. Para empezar, la educación de las poblaciones es crucial. Para ello, se deberían fomentar reglas básicas como: mantener la higiene, separar alimentos crudos y cocinados, cocinar los productos completamente, mantener los víveres a temperaturas seguras, usar agua y materias primas inocuas, etc. (OMS, 2007).

A nivel de la Región de Europa de la OMS, la carga de ETAs es la más baja del mundo, aun así, más de 23 millones de personas enferman cada año tras consumir alimentos contaminados, produciéndose 5.000 muertes asociadas. Tal y como ocurre a nivel internacional, las enfermedades diarreicas representan la mayoría de las ETAs. Las más comunes son las infecciones por norovirus, con unos 15 millones de casos, seguidas de las campilobacteriosis, que originan cerca de 5 millones de casos. *Salmonella enterica* no

tifoidea provoca el mayor número de muertes, contabilizando casi 2.000 al año. Además, la toxoplasmosis transmitida por alimentos, enfermedad protozoaria grave que se propaga por medio de carne cruda o mal cocida, así como verduras y frutas mal lavadas, puede causar hasta el 20 % de la carga de morbilidad de transmisión alimentaria y afecta a más de un millón de personas en la región cada año. La listeriosis también incide gravemente en la salud de quienes la contraen, causando alrededor de 400 muertes al año en la Región de Europa. Esta infección puede llegar a provocar septicemia y meningitis y se contrae habitualmente al consumir verduras crudas, alimentos listos para el consumo, carnes procesadas, pescado ahumado o quesos blandos contaminados (WHO, n.d.).

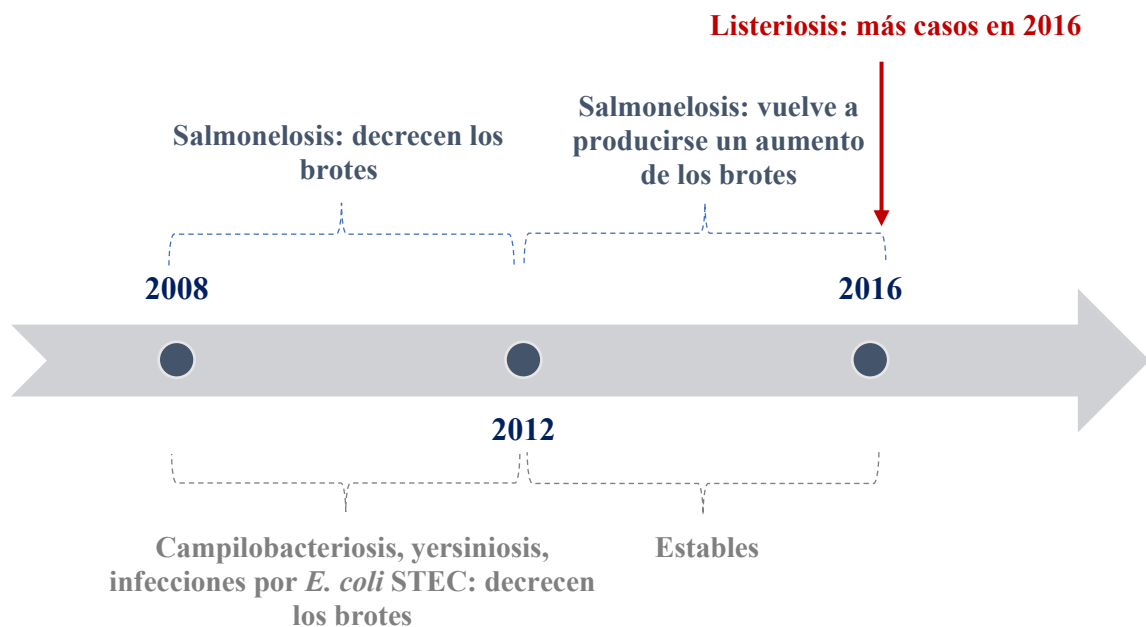


Figura 2. Tendencias de aparición de los brotes de transmisión alimentaria de 2008 a 2016 a partir de los datos proporcionados por EFSA y ECDC (2017). Elaboración propia.

En la **Figura 2**, se pueden observar las tendencias de aparición de brotes de los principales patógenos en Europa según un informe de la EFSA y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC). En total, en el año 2016, se notificaron 4.786 brotes transmitidos por los alimentos, incluidos los generados a través del agua. *Salmonella* spp. fue el agente causal más detectado, con uno de cada seis brotes debido a *S. enterica* ser. Enteritidis, seguido de otras bacterias, toxinas bacterianas y virus. *Salmonella* spp. y los

huevos continúan representando la combinación agente/alimento de mayor riesgo (EFSA, 2017).

3. Una problemática añadida: las resistencias a los antimicrobianos

Las resistencias a los antimicrobianos (RAM) corresponden a la capacidad de los microorganismos de resistir a la inhibición o actividad letal de un antimicrobiano, teniendo en cuenta la susceptibilidad normal de la especie en cuestión. El término antimicrobiano incluye cualquier sustancia con efecto bacteriostático o bactericida, que sea en un enfoque clínico o para reducir cargas microbianas en materiales y superficies. Esta denominación abarca entonces antibióticos utilizados para tratar infecciones en animales y humanos, así como biocidas químicos para desinfectar entornos de procesado de alimentos (Verraes et al., 2013).

Los antimicrobianos se han utilizado en medicina humana y veterinaria durante más de 70 años y han contribuido enormemente a la lucha contra las infecciones bacterianas. Sin embargo, en las últimas décadas, la aparición y diseminación de bacterias resistentes a antimicrobianos se considera, en estos momentos, uno de los principales desafíos del siglo XXI y una posible catástrofe mundial. En la Unión Europea, se estima que 25.000 pacientes mueren cada año y se gastan, aproximadamente, 1.500 millones de euros en costes adicionales de atención médica relacionados con bacterias resistentes a los antibióticos (Ruiz y Alvarez-Ordóñez, 2017).

Cuando los patógenos adquieren resistencias a los antimicrobianos, pueden suponer un mayor riesgo debido a un posible fracaso de los tratamientos de primera elección (e incluso pérdida total de opciones de tratamiento) y de la mayor probabilidad y/o gravedad de infecciones (*Codex Alimentarius* y FAO, 2015). Los microorganismos RAM no patogénicos también suponen un problema, ya que pueden transmitir sus mecanismos de resistencia a otros grupos microbianos. La mundialización y magnitud actual del comercio de los alimentos permite la expansión de estas RAM. Esto explica, en parte, que esta problemática sea actualmente una preocupación mundial y uno de los mayores retos en la protección de la salud pública (FAO, 2019). Los problemas asociados a las RAM están íntimamente relacionados con el uso de antimicrobianos en cualquier área, lo que incluye los usos humanos y veterinarios. La FAO, la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) y la

OMS han llegado a un consenso sobre el hecho de que los microorganismos RAM, transmitidos a través de los alimentos, constituyen un relevante riesgo microbiológico contra la inocuidad de los alimentos (*Codex Alimentarius* y FAO, 2015).

Las bacterias pueden utilizar varios mecanismos para ser resistentes: degradación enzimática (β -lactamasas para las penicilinas y cefalosporinas, acetiltransferasas para los aminoglucósidos, entre muchos otros), modificación de los antibióticos (conseguido, por ejemplo, por *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA)), cambios en la permeabilidad celular bacteriana (se reduce la entrada o se expulsa el antibiótico mediante bombas de reflujo) u otras vías para escapar al efecto inhibitorio o letal del antimicrobiano.

Las RAM pueden ser intrínsecas o adquiridas por mutación o transferencia horizontal de genes de resistencia (THGR). Los principales mecanismos de THGR son: i) la conjugación (transferencia de ácido desoxirribonucleico (DNA) entre dos células mediante contacto directo); ii) la transformación (una bacteria capta DNA libre en el ambiente procedente de otra bacteria lisada); iii) transducción (proceso mediado por bacteriófagos que se unen a las células bacterianas e inyectan el material genético). Intervienen en estos procesos varios elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones y transposones. Existen también otros procesos menos conocidos como la translocación de genes de resistencia y virulencia mediante vesículas. Parece ser, en este caso, que se transfieren partículas *virus-like* durante un proceso de fusión celular (Verraes et al., 2013).

3.1 Aparición y propagación de RAM

La utilización de antimicrobianos en animales y cultivos, destinados a la producción de alimentos, es un factor potencialmente considerado de riesgo a la aparición y propagación de microorganismos resistentes en los seres humanos. Estos microorganismos RAM se transmitirían a través del consumo de alimentos provenientes de dichos cultivos y/o animales. Actualmente, existe una creciente preocupación por la posibilidad de transmisión de las RAM a través de la cadena alimentaria (Ruiz y Alvarez-Ordóñez, 2017). La aparición de RAM es un fenómeno natural que se genera progresivamente con el tiempo, habitualmente por modificaciones genéticas. Sin embargo, este proceso se ve acelerado por el mal y/o excesivo uso de los antimicrobianos. Como ejemplos de su uso equivocado, se pueden citar: i) su administración para tratar infecciones víricas (como los resfriados

comunes o la gripe) en medicina humana; ii) su uso como estimulantes del crecimiento de animales (fuera de la UE); iii) para prevenir enfermedades en lotes de animales sanos en producción animal; iv) el abuso de biocidas y fitosanitarios en agricultura (Grugel y Wallmann, 2004). Estos microorganismos RAM están presentes en los humanos, los animales y el medio ambiente, incluyendo el agua, el suelo y el aire. Se pueden transferir de persona a persona, entre las personas y los animales e incluso a través de la alimentación de origen animal y vegetal. El mal control de las infecciones, las condiciones higiénico-sanitarias deficientes y la manipulación incorrecta de los alimentos aceleran la propagación de las RAM (OMS, 2018).

En las industrias alimentarias, durante los procesos de limpieza y desinfección, pueden quedar áreas donde no se alcanzan las concentraciones óptimas de biocidas. Suele ocurrir en zonas de difícil acceso como bajo los equipos, en grietas, entre otras, o simplemente como consecuencia de un uso inadecuado. La presencia de materia orgánica (conocida por inactivar algunos biocidas como los compuestos clorados) puede reducir la eficacia de los desinfectantes. Las concentraciones de biocidas también pueden ser insuficientes, si se enjuagan las superficies con demasiada frecuencia o se aplica sobre superficies mojadas, ya que se diluye el compuesto químico. Además, en las vías de eliminación de aguas residuales, puede producirse un contacto permanente de microorganismos con bajas concentraciones de antimicrobianos. Por ejemplo, se han identificado concentraciones subletales de compuestos de amonio cuaternario en sedimentos de ríos y aguas residuales de hospitales. Es probable que suceda lo mismo con las aguas residuales de explotaciones ganaderas, mataderos e instalaciones de procesamiento de alimentos. Por lo tanto, las comunidades microbianas presentes en hospitales, granjas, mataderos e instalaciones de producción de alimentos están expuestas de manera recurrente a agentes desinfectantes, y a veces, en concentraciones insuficientes. La mala praxis genera un impacto en la ecología microbiana, acelerando la aparición de RAM y su propagación (Ruiz y Alvarez-Ordóñez, 2017).

3.2 Soluciones y medidas a tomar

La dimensión multisectorial que abarca la presente problemática hace que se deban aplicar medidas en todos los ámbitos implicados. El manejo de las RAM, a lo largo de la cadena alimentaria, es complejo y requiere implementar buenas prácticas desde la producción primaria hasta el consumo. La FAO apoya concretamente tener buenas prácticas de higiene

y medidas de prevención a la contaminación, así como el uso responsable de antimicrobianos para reducir el riesgo. Este trabajo empieza en la granja, donde todos y cada uno de los operarios de la cadena alimentaria se deben adherir a las buenas prácticas de higiene. Los sistemas de vigilancia y monitorización deben rastrear el uso de antimicrobianos y la emergencia de RAM a través de la cadena alimentaria. De hecho, en determinados países ya existen programas de monitorización de residuos de medicamentos veterinarios y/o de vigilancia de RAM (Plan Nacional de Investigación de Residuos - PNIR en España y Plan Nacional Resistencia Antibióticos - PRAN, como ejemplos). Estos programas se deben implantar en el máximo número de países posibles y reforzarlos en los que lo necesiten. La FAO asesora a países para que desarrollen programas de vigilancia nacionales y habiliten laboratorios de referencia (FAO, 2019).

El *Codex Alimentarius* es el punto de partida para las autoridades de control de alimentos para enfrentar a las RAM. Recoge una serie de normas relativas a las RAM, abarcando desde medicamentos veterinarios hasta residuos derivados, higiene de los alimentos y alimentación animal, etc. Estas normas tienen por objetivo prevenir el desarrollo de RAM y minimizar su transmisión, a lo largo de la cadena alimentaria. En este sentido, la FAO, OMS y OIE colaboran, desde hace más de una década, para aportar asesoramiento científico sobre ello. Algunas de las cuestiones a considerar, en el futuro, incluyen las prácticas actuales de higiene de los alimentos y las directrices relacionadas con los residuos de plaguicidas y medicamentos veterinarios, el uso de desinfectantes/ biocidas, así como el manejo del agua y el estiércol en la cadena alimentaria.

Además, la comunicación y sensibilización de productores y autoridades competentes es crucial en la lucha contra las RAM. El problema es de difícil solución en países que poseen un sistema de control de alimentos débil y fragmentado. Muchas veces, la falta de estructuras y regulación imposibilita la implementación y monitorización de la inocuidad de los alimentos a nivel nacional. Es imperativo crear sistemas nacionales fuertes de control de alimentos, incluyendo sistemas de gestión apropiados, así como acciones para minimizar el impacto de las RAM. Estas mejoras deben ir acompañadas de progreso en otras áreas como aquéllas mencionadas anteriormente: como la agricultura y la ganadería (FAO, 2019).

En España, las autoridades han decretado que a partir de este año 2019, todos los veterinarios deberán notificar las prescripciones de antibióticos realizadas para animales de producción. El objetivo de esta medida es llevar un control de la utilización de antibióticos empujando a

los profesionales a una mejor praxis (Anónimo, 2018). Existe también una categorización de los antibióticos de uso clínico, que tiene por objetivo disminuir el uso de determinadas moléculas esenciales para el tratamiento de algunas patologías humanas y preservar estos fármacos al máximo (European Medicines Agency, 2019). En este sentido, el concepto *One Health* (“Una Sola Salud”) es también una estrategia mundial para aumentar la comunicación y la colaboración interdisciplinar, en el cuidado de la salud de las personas, los animales y el medio ambiente, entendiendo que todas están ligadas entre sí (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2019).

3.3 RAM en industrias alimentarias

Los seres humanos pueden estar entonces expuestos a microorganismos RAM, a residuos de agentes antimicrobianos procedentes de animales y cultivos, destinados a consumo humano, y a microorganismos RAM, establecidos en las instalaciones alimentarias, que también hayan adquirido mecanismos de resistencia. Por esta razón, la problemática planteada tiene mucha relevancia para la industria alimentaria, donde se ha observado ampliamente su contribución en los últimos tiempos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Múltiples y diversos ejemplos de RAM observadas en el ámbito alimentario de 2016-2018. Elaboración propia.

Patógeno	Objeto del estudio	Observaciones	Referencia y ubicación del estudio
<i>Campylobacter jejuni</i>	Exposición a concentraciones subletales de 5 biocidas.	Capacidad de adaptación a estos biocidas con una elevada CMI y resistencia a kanamicina y estreptomycinina.	Techaruvichit et al. (2016); Japón
<i>Clostridium perfringens</i>	Prueba de eficacia de 5 tipos de desinfectantes comúnmente utilizados en explotaciones ganaderas e industrias alimentarias.	Resistencia a 4 de los 5 productos: monopersulfato de potasio, cloruro de amonio cuaternario, peróxido de hidrógeno y soluciones de glutaraldehído.	Charlebois et al. (2017); Canadá
<i>Escherichia coli</i> resistente a las cefalosporinas de amplio espectro (ESC)	Seguimiento de más de 1 año de muslos de pollo, 4 marcas diferentes para ver el impacto de las políticas de reducción del uso de ceftiofur en pollos.	n= 44/48; 91,7 % de las muestras positivas a <i>E. coli</i> resistente a ESC.	Casella et al. (2017); Francia
<i>Salmonella</i> spp.	Capacidad de resistencia a antibióticos en 152	92,8 % de los aislados eran resistentes a más de un antibiótico: oxitetraciclina (80,9 %),	Deng et al. (2018); China

	aislados de minoristas de productos de origen animal.	trimetoprima (64,5 %), amoxicilina (28,9 %), levofloxacina, ciprofloxacino y gentamicina.	
<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	Papel de los terneros como fuente de STEC con 100 muestras (50 hisopos rectales y 50 muestras de carne).	<i>E. coli</i> resistente a más de un antimicrobiano de uso común con una prevalencia de n = 21/50 con hisopado rectal y n = 16/50 en muestras de carne.	Hassan (2018); Bangladesh
<i>E. coli</i> portadora de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)	Valoración de riesgo de 208 combinaciones animal/bacteria/antimicrobiano.	Mayor riesgo en carne de pollo por <i>E. coli</i> portador de BLEE.	Collineau et al. (2018); Suiza
<i>Listeria monocytogenes</i>	Análisis de la multiresistencia de un gran número de cepas de este patógeno.	De 259 cepas de serotipo molecular patogénico conocido, un total de 145 cepas eran multiresistentes (a más de 3 antibióticos). Sin embargo, ninguna era resistente al tratamiento de elección que consiste en ampicilina y gentamicina.	Noll et al. (2018); Alemania
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	Presencia de MRSA en carne de búfalo.	Detección de <i>S. aureus</i> en 62,5 % (n=25/40) y 52 % (n=13/25) presenta gen de resistencia (<i>mecA</i>).	Ruban et al. (2018); India

La persistencia de determinadas cepas de *L. monocytogenes*, incluso después de la limpieza y desinfección de la industria alimentaria, sugiere que puede estar relacionada con la exposición a una reducida concentración (subinhibitoria) de desinfectantes. Este fenómeno se puede explicar por: i) la existencia de nichos o reservorios en el ambiente no alcanzados por los desinfectantes, ii) la formación de biofilms y la consecuente creación de microambientes protegidos, y iii) la adquisición de mecanismos de resistencia por *L. monocytogenes*. Se ha descrito, por ejemplo, la resistencia genotípica a compuestos de amonio cuaternario (QAC) por este patógeno. Se han caracterizado múltiples “bombas de reflujo” que confieren cierta resistencia a los QAC. No obstante, influye también, como se ha comentado anteriormente, la dilución o inactivación de los QAC en el ambiente por un protocolo erróneo de limpieza y desinfección. Esta resistencia a QAC puede finalmente contribuir a su adaptación y persistencia ambiental (Martínez-Suárez, 2016; Møretro et al., 2017).

Las bacterias introducidas deliberadamente en los productos alimenticios, como los iniciadores de la fermentación y/o probióticos, también pueden adquirir RAM y contribuir a su propagación a lo largo de la cadena alimentaria. Los microorganismos más utilizados para

estas aplicaciones son las bacterias del ácido láctico (BAL) (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. o *Enterococcus* spp.) y hongos (*Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Penicillium* spp. o *Aspergillus* spp.) (Ruiz y Alvarez-Ordóñez, 2017).

Teniendo en cuenta la magnitud de esta problemática, es imprescindible progresar en la caracterización de la aparición, la propagación y el impacto de las RAM sobre la salud pública, a través de la cadena alimentaria.

4. Sector cárnico y su implicación en las ETAs

4.1 Magnitud del sector

Dentro del sector cárnico, se comercializan dos tipos de carne. Por una parte, existe la categoría carne fresca, es decir la carne que no ha sido sometida a procesos de conservación distintos de la refrigeración, la congelación o la ultracongelación, incluida la carne envasada al vacío o envasada en atmósfera modificada (Anónimo, 2004b). Se refiere a los siguientes tipos: carne de vacuno, pollo, ovino/caprino, cerdo, conejo, otras carnes frescas (avestruz, pavo, resto de carnes frescas de especies no contempladas anteriormente) y despojos de estas mismas especies. Por otra parte, la categoría carne transformada/procesada corresponde, por ejemplo, al jamón curado y paleta, lomo, chorizo, salchichón y salami, fuet y longaniza, jamón cocido, paleta cocida y fiambres.

La industria cárnica es el cuarto sector industrial de España, por detrás de la industria automovilística, del petróleo y combustibles y la producción y distribución de energía eléctrica. El sector agroalimentario representa un 12 % del PIB (AECOC, 2018). Este sector, formado por mataderos, salas de despiece e industrias de elaborados, tiene un tejido industrial constituido por cerca de 3.000 empresas. La producción conjunta de todas estas empresas hace que la industria cárnica ocupe con diferencia el primer lugar dentro de toda la industria española de alimentos y bebidas, representando una cifra de negocio de 24.000 millones de euros, el 22,3 % de todo el sector alimentario. En 2017, a pesar de un crecimiento del 1,6 %, menos pronunciado respecto a 2016, la carne de porcino ha registrado, un año más, un récord de producción, alcanzando los 4,25 millones de toneladas. Por su parte, el sector vacuno consolidó la tendencia de recuperación iniciada a partir de 2014 y se produjeron finalmente 641.003 toneladas de carne (un incremento de 0,6 % respecto al año anterior). En cuanto al ovino/caprino, cayó un 1 % respecto al volumen de 2016, con 125.487

toneladas. En lo que refiere al destino de la carne generada, cerca del 60 % de la producción de carne de porcino es para consumo directo y el 40 % para consumo industrial. En cambio, en el caso del vacuno y el ovino/caprino, la práctica totalidad (92 % y 98 % respectivamente) es para su consumo directo.

El volumen total de producción de carne en España representa el 3,75 % de la producción mundial. Se consolida en estos últimos años, como el cuarto mayor productor de carne de porcino, por detrás de China (generando el 47,9 % de la carne de cerdo de todo el mundo), Estados Unidos (10,4 %) y Alemania (5,1 %). En cuanto a elaborados cárnicos, España, con 1,38 millones de kilos anuales, se sitúa en cuarto lugar en la Unión Europea, por detrás de Alemania, Italia y Francia. Relativo a los productos, destacan en volumen los fiambres cocidos y en valor los jamones y paletas curados (blancos e ibéricos) (Asociación Nacional de las Industrias de la Carne de España - ANICE, 2017).

El sector se mantiene en buen estado, pero aun así se ve amenazado por desafíos globales como la degradación del medioambiente, el crecimiento de la población mundial, la creciente preocupación de la sociedad por el bienestar animal, la falta de transparencia y buena comunicación hacia los consumidores, la llegada de enfermedades como la peste porcina africana o, una vez más, las resistencias a los antimicrobianos, mencionadas anteriormente (AECOC, 2018).

4.2 La carne: vehículo de transmisión de patógenos

A pesar de las mejoras aplicadas en cuanto a higiene del sector, la carne sigue siendo responsable de una proporción significativa de ETAs. Los peligros relacionados con este tipo de productos pueden tener un origen biológico, químico o físico o incluso a veces más difíciles de clasificar, como pudo ser el agente de la encefalopatía espongiforme bovina. Los principales patógenos bacterianos de transmisión alimentaria vehiculados por la carne son *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* y *L. monocytogenes* (Gobierno de Navarra y CONSEBRO, 2012). La presencia de estos patógenos en canales o productos finales se debe, mayoritariamente, a una contaminación fecal. Los propios procedimientos del matadero hacen que las canales se contaminen. Además, otro de los riesgos importantes es el papel que juegan los propios operarios de estos establecimientos en la propagación de estas bacterias. En este sentido, es crucial rebajar la

presencia de estos patógenos en las explotaciones ganaderas para minimizar su entrada en los establecimientos de sacrificio y procesado de carne (Gomes-Neves et al., 2012). La carne no sólo puede transmitir patógenos bacterianos, sino que también puede ser vehículo de virus como norovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, E y parásitos como *Toxoplasma* y cisticercosis, entre otros.

De hecho, en un reciente estudio de metaanálisis, se evaluaron los niveles de incidencia de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Campylobacter* spp. en carne de pollo comercializada en Europa. Los resultados sugieren que *S. aureus* es el principal agente patógeno detectado en la carne de aves de corral (38,5 %), seguido de *Campylobacter* spp. (33,3 %), mientras que *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. tienen la prevalencia más baja actual (19,3 % y 7,10 %, respectivamente). A pesar de las diferencias en la prevalencia, todos los agentes patógenos se encontraron en pollos y otras carnes de aves de corral, tanto en la etapa de procesado final como a nivel minorista, en productos envasados y sin envasar y en varios tipos de cortes de carne (Gonçalves-Tenório et al., 2018).

Nótese la importancia de los equipos y utensilios, como se puede observar en la **Tabla 3**, también portadores de patógenos, que pueden contaminar los alimentos con los que entran en contacto. Se habla, en estos casos, de contaminación cruzada, que es la transferencia de agentes contaminantes de un entorno contaminado a otro que no lo está. Las contaminaciones cruzadas se pueden deber a varios factores, destacando entre ellos, el confinamiento de patógenos dentro de microcavidades, debido a la rugosidad superficial (surcos y arañazos) (Awad et al., 2018). Múltiples estudios muestran la capacidad de transferencia de microorganismos entre alimentos y superficies, manos, utensilios, entre otros, y ponen en evidencia el relevante papel de las contaminaciones cruzadas como responsables de ETAs (Dantas et al., 2018; Dourou et al., 2011; Grove et al., 2015; Jensen et al., 2017; Kim et al., 2014; Sauders y D'Amico, 2016).

Tabla 3. Estudios de los años 2017-2018 que han detectado la presencia de patógenos en canales, muestras de carne, fecales o ambientales. Elaboración propia.

Patógeno y/o toxina	Especie animal	Número de muestras positivas al patógeno/toxina correspondiente	Referencia y ubicación
<i>Escherichia coli</i> STEC	Vacuno	n= 16/50; 32 % de las muestras de carne.	Hassan (2018); Bangladesh
<i>E. coli</i>	Vacuno	61,5 % de las muestras de cuchillos para sangrar y desollar; 30,76 % de las muestras de carne de cabeza, esófagos y carne separada mecánicamente (hasta 2 UFC*/g).	dos Santos et al. (2017); Brasil
<i>Listeria monocytogenes</i>	Pollos	8,64 % de las 920 muestras de pechuga, 44,19 % de las 774 muestras de muslos, 5,24 % de 297 muestras de equipos y utensilios.	Schäfer et al. (2017); Brasil
<i>L. monocytogenes</i>	Conejos	11 % de n=1285 muestras de carne y ambiental, prevalencia más alta en cortes y productos; 27,9 % y 14,3 % en cortes y canales con recuentos > 1 UFC /10 g; mayoría de las muestras ambientales positivas provenían de las cintas transportadoras.	De Cesare et al. (2017); Italia
<i>L. monocytogenes</i>	Renos	3 % de las muestras fecales.	Laaksonen et al., (2017); norte de Finlandia y Noruega
<i>Yersinia spp.</i>		10 % de las muestras fecales.	
Toxina Shiga		33 % de las muestras fecales.	
<i>Salmonella</i> (predominio <i>S. enterica ser. Typhimurium</i>)	Cerdos	10/48 canales, 19/96 linfonodos, 4/48 muestras fecales, 2/6 muestras de agua y 1/6 cuchillos para el degollado.	Cabral et al. (2017); Brasil
<i>Salmonella spp.</i>	Pequeños rumiantes	17,1 % en pieles y 13,9 % en muestras fecales.	Hanlon et al. (2018); E.E.U.U, Bahamas y Méjico
<i>E. coli</i> O157		1,5 % en pieles y 15,3 % en muestras fecales.	
<i>Campylobacter</i>		80,7 % en heces (explotación ganadera).	
<i>Campylobacter caecum</i>	Pollos	Pool de muestras de cuello y contenido cecal en 3 mataderos: 42,7 % (n= 117), 21,7 % (n= 120) y 47,9 % (n= 119).	Reich et al. (2018); Alemania
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Pollos	n= 25/100 muestras de muslo; 25 %.	Sirghani et al. (2018), Irán
Norovirus	Cerdo	n= 2 (loncheadora y manos de un trabajador) /90.	Markantonis et al. (2018); Chipre

*Si no se especifica, las muestras se tomaron en matadero o planta cárnica.
UFC: unidades formadoras de colonias.

Las contaminaciones cruzadas no sólo ocurren en el ámbito industrial sino también en los hogares de los consumidores (Evans y Redmond, 2018; Gorman et al., 2002; Lubber et al., 2015). En vista de las prevalencias de patógenos observadas en los últimos 3 años (Tabla 3), además de mejorar la higiene en estos establecimientos, es fundamental educar a la población para reducir el riesgo de contaminaciones cruzadas en el ámbito doméstico (Beumer y Kusumaningrum, 2003) (Figura 3).



Figura 3. Ejemplo evidente y frecuente de contaminación cruzada y de la falta de formación y concienciación de personas que manipulan alimentos: al colocar los pollos crudos encima de otros casi listos para servir, los jugos de los pollos sin cocer contaminan la carne de los más cocidos. Bruno Benier (n.d), Poulets rôtis entrain de cuire au marché, fotografía con licencia de Adobe Stock.

El enfoque contemporáneo, basado en el riesgo, requiere que las medidas de higiene sean aplicadas en los puntos más relevantes para el control de peligros. Esto debería verse reflejado en la aplicación de medidas específicas, que estén basadas en la ciencia y en la evaluación de riesgo, y con mayor énfasis en prevención y control de la contaminación durante el procesado. La aplicación de los principios del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) es un elemento esencial, ya que los programas basados en el riesgo han demostrado ser exitosos en el control de peligros, hasta lo requerido para la protección del consumidor. De hecho, están basados en resultados más que en la única aplicación de normas y reglamentos (Gobierno de Navarra y CONSEBRO, 2012).

4.3 Reflexión sobre la situación del sector de producción cárnica

Los mataderos representan claramente la etapa más crítica en cuanto a contaminación de las canales y posteriores productos derivados. Las fuentes de contaminación de las canales son muy diversas, como pueden ser las heces, la piel, el tracto gastrointestinal, los linfonodos, el agua, el aire y los operarios (Fratamico et al., 2009). En estas instalaciones, se produce el paso de los animales procedentes de las explotaciones ganaderas a la producción de carne en canales. Los animales vehiculan patógenos presentes en las granjas (potencialmente multirresistentes a antimicrobianos) a este tipo de industrias alimentarias y, por consiguiente,

al resto de la cadena alimentaria. Las canales y despojos pueden incluso verse contaminados por agentes bacterianos residentes en las instalaciones como han mostrado Projahn et al. (2019). En este estudio alemán, se analizó carne de pollo proveniente de animales originalmente libres de bacterias productoras de betalactamasa de amplio espectro (BLEE). Se evidenció, por análisis filogenético, que las canales se contaminaban con diferentes enterobacterias, entre ellas *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE, durante los procesos de escaldado y desplumado en el matadero. El cumplimiento estricto de las buenas prácticas de higiene durante cualquier etapa de sacrificio es de vital importancia, para evitar la contaminación de la carcasa y la consiguiente entrada de patógenos en la cadena alimentaria (Laaksonen et al., 2017). Otro estudio brasileño demostró incluso que la propia inspección de las canales, por los equipos veterinarios, en especial el corte de linfonodos contaminados, aumentaba el riesgo de contaminar las canales de cerdo con *Salmonella* spp., aunque fuera en bajas cantidades (Costa et al., 2017).

En cuanto a los requisitos generales de higiene, todo está recogido en los Reglamentos 852/2004 y 853/2004 (Anónimo, 2004a, 2004b). La legislación vigente es en ocasiones poco concreta. No hay ningún tiempo límite establecido de cuándo los productos deben alcanzar la temperatura fijada de conservación, se habla de “*mayor rapidez posible*” (Gobierno de Navarra y CONSEBRO, 2012). Puede haber cierta flexibilidad, pero límites bien establecidos podrían ayudar a las autoridades competentes y a los profesionales que deben garantizar que éstas se cumplan.

La gestión de los mataderos es además compleja, ya que hay mucha rotación de personal, los operarios no reciben siempre formación adecuada o al menos en el idioma conveniente y adaptado a ellos, por no mencionar, las condiciones de trabajo (cadencia, pocos y breves descansos, temperaturas ambientales extremas en invierno y verano, etc.). En algunos mataderos, cabe destacar que los operarios son subcontratados y ejercen entonces como “autónomos”. No hay por consiguiente ni sentimiento de pertenencia a una entidad o empresa, crucial para educar y mejorar la praxis de los trabajadores, ni protección social básica. Estos hechos complican indudablemente los progresos en higiene y manipulación de la empresa (Skaarup, 1985).

En cuanto a procedimientos de limpieza y desinfección, lo mejor es que haya un equipo con esta función y que ésta sea su responsabilidad. Se debería plantear una forma de automatizar o mecanizar la limpieza. Muchas veces, no hay tampoco nada previsto para secar las

instalaciones, cuando es conocido que la sequedad frena claramente el desarrollo de muchos microorganismos. Las superficies industriales húmedas representan un sólido sustrato para el desarrollo de ecosistemas organizados y persistentes, llamados biofilms, que pueden albergar microorganismos patógenos (Bridier et al., 2015). La temperatura no se empieza a controlar hasta el final del proceso de carnización, cuando las canales se conducen a las cámaras de enfriamiento-almacenamiento. En este sentido, a más temperatura, más formación de biofilms, que pueden favorecer así las contaminaciones cruzadas explicadas anteriormente (Di Ciccio et al., 2015; Poimenidou et al., 2016). Con todo ello, el control microbiológico de las superficies y la aplicación de mejoras adaptadas a los procesos, serán completamente claves en la prevención de la contaminación masiva en esta primera etapa del proceso productivo.

5. Biofilms

5.1 Definición

En el medio ambiente, las bacterias se pueden encontrar en dos estados totalmente diferentes que son: estado planctónico, es decir, flotando libremente, relevante para poder propagarse; y estado sésil, es decir, adheridas a una superficie, les permite persistir y resistir a las condiciones desfavorables del entorno en el que permanecen.

Los biofilms (o biopelículas) son comunidades microbianas complejas adheridas a una superficie que puede ser biótica o abiótica. Estas agregaciones de microorganismos no sólo están unidas a la superficie, sino que crecen y colonizan ambientes (Costerton y Stewart, 2001). Cualquier microorganismo que sea alterante o patógeno puede formar biofilms (Parsek y Singh, 2003). Estas biopelículas están caracterizadas por sus interacciones entre las poblaciones presentes. Los biofilms están compuestos por subpoblaciones heterogéneas, que se comportan de forma distinta entre sí, contribuyendo a su éxito ecológico global. Producen diferentes compuestos tales como sustancias poliméricas extracelulares (EPS), proteínas, ADN extracelular y sobreviven de forma organizada, estableciendo unas estructuras tridimensionales determinadas y exhibiendo caracteres genotípicos y fenotípicos propios (González-Rivas et al., 2018). Son difíciles de describir brevemente ya que presentan muchas formas, mecanismos, ecologías, heterogeneidad fisiológica y genética, resistencia a desinfectantes y antimicrobianos (Jahid y Ha, 2012). Un sustrato sólido, agua y algunos nutrientes ya son suficientes para permitir la construcción de esta verdadera fortaleza

microbiana. Estas matrices orgánicas y gelatinosas, que consisten en mezclas complejas de biopolímeros de producción propia, aseguran la cohesión de estas estructuras biológicas y contribuyen a su resistencia y persistencia. Los biofilms conceden mayor probabilidad de supervivencia, desarrollo y colonización de nuevos espacios a quienes los generan (Whitehead et al., 2015). Las células que conforman un biofilm son más resistentes al estrés ambiental, incluido agentes antimicrobianos, limpieza y desinfección, desecación, etc. que las células planctónicas (O'Toole et al., 2000). Esta estrategia para sobrevivir favorece la persistencia de patógenos microbianos en industrias alimentarias y contaminaciones cruzadas recurrentes a productos alimenticios (Bridier et al., 2015; Martínez-Suárez et al., 2016; Poimenidou et al., 2016).

5.2 Biofilms mixtos

En dos décadas, se ha comprendido que los biofilms están constituidos por comunidades estructuradas y protegidas por una matriz. Estas últimas expresan genes de forma muy diferente a cuando se hallan en su estado planctónico. Los biofilms formados a partir de cultivos puros, muy estudiados, muestran una organización básica en la que las células crecen en microcolonias encerradas en una matriz separada por una red de canales de agua (Phillips, 2016; Stoodley et al., 2002). No obstante, las biopelículas bacterianas de tipo salvaje, es decir, aquéllas que no se generan artificialmente en laboratorios, sino que se encuentran de forma natural, están constituidas normalmente por muchas especies bacterianas distintas. Estas especies exhiben, generalmente, diferentes propiedades de crecimiento y supervivencia, que resultan en una heterogeneidad multidimensional (Alpkvist y Klapper, 2007). La composición y la organización espacial de las biopelículas mixtas también son distintas a lo largo de los canales, en las que puede estar influyendo las necesidades de nutrientes y ritmos de crecimiento de cada especie (Lee et al., 2014). Wang et al. (2013) observaron también que las cepas productoras de EPS con mayor capacidad de formación de biofilm pueden establecerse en biofilms mixtos de manera más eficiente.

Debido a que las observaciones directas muestran, que la mayoría de las formas bacterianas encontrada en los ecosistemas naturales, están formadas por biofilms, incluyendo a los microorganismos patógenos, no parece prudente continuar extrapolando los cultivos planctónicos a los estudios de estos sistemas (Stoodley et al., 2002). Además, se deben tener en consideración otros factores cuando se trabajan con estas comunidades bacterianas, como

por ejemplo, el nutriente aplicado, el material de las superficies, las concentraciones de los inóculos, ya que los resultados obtenidos pueden variar completamente (Dourou et al., 2011; Leriche et al., 2003; Mellefont et al., 2008; Zilelidou y Skandamis, 2018).

Como muestran varios autores, los biofilms compuestos por varias especies son más resistentes a las agresiones externas, como podría ser un desinfectante, en comparación con los biofilms monoespecie (**Tabla 4**) (Burmølle et al., 2006; Charlebois et al., 2017; Giaouris et al., 2013; Jahid y Ha, 2012; Lee et al, 2014; Veen y Abee, 2011). Los biofilms actúan como “refugio ambiental” favoreciendo así la supervivencia de *C. jejuni* (Ica et al., 2012). En el caso de un biofilm formado por *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas cepacia*, la viscosidad de la matriz, caracterizada por la producción de alginato, se incrementa significativamente al combinarse con mucina, iones de calcio y exopolisacáridos de *P. cepacia*. La presencia de esta extensa matriz, formada por diversos polisacáridos, reduce significativamente la difusión y, por lo tanto, la actividad antimicrobiana de la tobramicina y ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa* (Jahid y Ha, 2012). Se ha demostrado que las interacciones entre microorganismos potencian la formación de estas estructuras, para poder protegerse eficientemente del entorno en general (Burmølle et al., 2006; Veen y Abee, 2011). De manera similar, debido a que un biocida puede inactivarse en la matriz de un biofilm por enzimas, éstas pueden actuar contra los compuestos tóxicos. Por ejemplo, Stewart et al. (2002) observaron que el peróxido de hidrógeno era capaz de penetrar y dañar parcialmente a las células de *P. aeruginosa*, que conformaban un biofilm, cuando éstas eran deficientes en la enzima catalasa.

Tabla 4. Ejemplos de biofilms mixtos generados *in vitro* y sus características *versus* los biofilms monoespecie de las especies correspondientes. Elaboración propia.

Especies	Características de los biofilms mixtos estudiados	Referencia
<i>Kocuria</i> spp., <i>Brevibacterium linens</i> y <i>Staphylococcus sciuri</i>	Protección de <i>S. sciuri</i> por <i>Kocuria</i> spp. contra la solución alcalino-clorada. Susceptibilidad decreciente a ésta a medida que el biofilm madura y debido al consumo de cloro libre por exoproteínas del biofilm.	Leriche et al., (2003)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7 puede llegar a producir una cantidad de biomasa 400 veces mayor cuando coexiste con <i>A. calcoaceticus</i> .	Habimana et al. (2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas cepacia</i>	Mayor viscosidad de matriz y menor difusión y, por lo tanto, menor actividad antimicrobiana de la tobramicina y ciprofloxacino	Jahid y Ha (2012)
<i>Campylobacter jejuni</i> y <i>P. aeruginosa</i>	Estructuras y actividad diferentes. De hecho, las células aparentemente vivas pertenecientes al biofilm monoespecie, según la tinción <i>Live/Dead</i> , no eran cultivables y las mismas encontradas en el biofilm multiespecie sí lo eran. Más resistentes a flujos más intensos (de 1 a 2,5 ml/min).	Ica et al. (2012)
<i>E. coli</i> O157: H7 y <i>Salmonella</i> Typhimurium	Mayor resistencia de estas especies a desinfectantes de uso común.	Wang et al., (2013)
<i>P. aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas protegens</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Estructura distinta <i>versus</i> biofilm monoespecie. Tardó más en formarse (1 a 2 días más), mayor resistencia, una especie no mayoritaria puede conferir inmunidad a todo el biofilm.	Lee et al. (2014)
<i>Clostridium perfringens</i> con <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>E. coli</i>	Más resistencia a los desinfectantes.	Charlebois et al. (2017)

Otro hallazgo referente a los biofilms mixtos es que una especie puede conferir protección a las otras y no depende de su predominancia dentro de la población (Lee et al., 2014; R. Wang et al., 2013). El nivel de resistencia a la tobramicina de la comunidad bacteriana constituida por *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *P. protegens* aumentó en comparación con los biofilms monoespecie respectivos. *P. protegens*, que contribuye normalmente en el 15 % de la biomasa total del biofilm, fue capaz de proteger a las otras dos especies presentes, consiguiendo finalmente que sólo el 10 % del biofilm mixto fuera eliminado (Lee et al., 2014). Es interesante notar que no se observa esta capacidad de resistencia global del biofilm en cultivos planctónicos mixtos, lo que lleva a pensar que los biofilms son una estructura peculiar y muy compleja (Lee et al., 2014). De hecho, Leriche et al. (2003) observaron una determinada configuración espacial en presencia de una solución alcalino-clorada, ya que las células de *S. sciuri* se disponían en forma de anillo alrededor de las microcolonias de

Kocuria spp. En el momento en que el cloro añadido quedó totalmente consumido, *S. sciuri* ya no se agrupó alrededor de las microcolonias de *Kocuria* spp. Al revés, se dispersó uniformemente por el sustrato como células individuales o en grupos pequeños, igual que lo estaba antes de la exposición al tratamiento químico.

En los biofilms mixtos, la presencia de una especie puede potenciar el crecimiento de otra (Alpkvist y Klapper, 2007). Por ejemplo, *E. coli* O157:H7 puede llegar a producir una cantidad de biomasa 400 veces mayor cuando coexiste con *A. calcoaceticus*, en comparación con el monocultivo bajo las mismas condiciones ambientales (Habimana et al., 2010). La biomasa de *K. pneumoniae* dentro del biofilm mixto fue también significativamente mayor que la de los biofilms monoespecie, a pesar de tener menos acceso a los nutrientes debido a la competencia existente con *P. aeruginosa* y *P. protegens*. Este hecho podría explicarse por la increíble cooperación metabólica entre especies que permite a *K. pneumoniae* alcanzar una mayor biomasa sin inputs adicionales de carbono (Lee et al., 2014). No obstante, las sinergias en los biofilms mixtos suelen ser minoritarias. Røder et al. (2015) probaron 70 combinaciones de biofilms mixtos a partir de, cada vez, 4 especies distintas aisladas de una misma tabla de cortar. Observaron un efecto sinérgico en sólo el 22 % de los biofilms generados a 15°C y en tan sólo el 3 % a 24°C. Por lo tanto, el hecho de alejarse de la temperatura óptima de crecimiento podría ser un factor condicionante a la sinergia entre las especies que conforman los biofilms.

5.3 Proceso de formación

La formación de biopelículas es un proceso multifactorial que todavía no se conoce completamente. La creación, la arquitectura y el comportamiento de estas comunidades son fenómenos complejos influenciados por propiedades relativas a la superficie, microbiológicas y medioambientales (Whitehead y Verran, 2015). La formación y posterior desarrollo de biofilms se puede ver afectado por muchos factores (**Figura 4**). Entre ellos destaca la propia cepa bacteriana, las propiedades de la superficie (material), parámetros medioambientales como el pH, la temperatura y los nutrientes disponibles (Di Ciccio et al., 2015; Donlan, 2002).

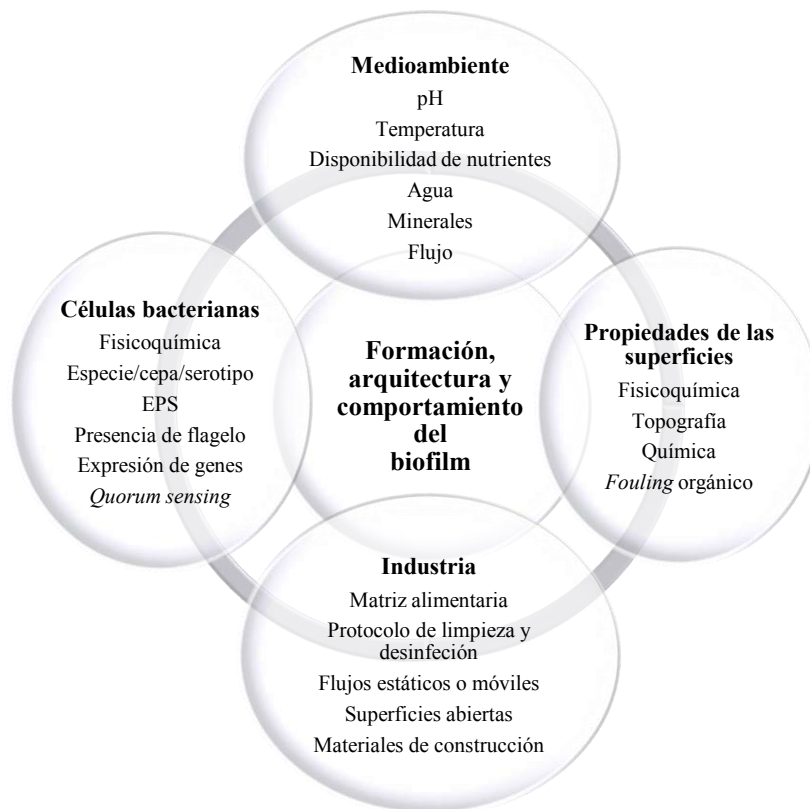


Figura 4. Interacciones complejas entre factores que afectan al proceso de formación, arquitectura y comportamiento de los biofilms. Modificado a partir de Whitehead y Verran, 2015.

En general, todas las superficies pueden albergar biofilms incluyendo plásticos, vidrio, metal, madera, superficies de los alimentos, etc. (Donlan, 2002). El tipo de material de las superficies tiene una implicación directa sobre la seguridad alimentaria, ya que determinados materiales favorecen la adhesión de bacterias y el consiguiente riesgo de contaminación del producto (Di Bonaventura et al., 2008). Las propiedades de la superficie son cruciales en la adhesión bacteriana. *S. aureus* presenta, por ejemplo, más facilidad para formar biopelículas en poliestireno *versus* acero inoxidable (Di Ciccio et al., 2015; Poimenidou et al., 2016). Otros factores son también determinantes para la formación de biofilms, como los flagelos para *Y. enterocolitica* (Kim et al., 2008) o la capacidad de motilidad para *Bacillus cereus* (Houry et al., 2010).

La colonización bacteriana de las superficies es un proceso dinámico y gradual y en la maduración final de los biofilms intervienen diferentes procesos físicos, químicos, genéticos y biológicos. Aunque no está claramente definido, hay más o menos cinco pasos involucrados en la formación y evolución de estas estructuras. Estas etapas se podrían definir como: (1) unión reversible a la superficie, (2) unión irreversible mediante la producción de

EPS y *quorum sensing*, (3) formación de microcolonias, (4) colonización o etapa de maduración y (5) dispersión (**Figura 5**) (Jahid y Ha, 2012; Srey et al., 2013).

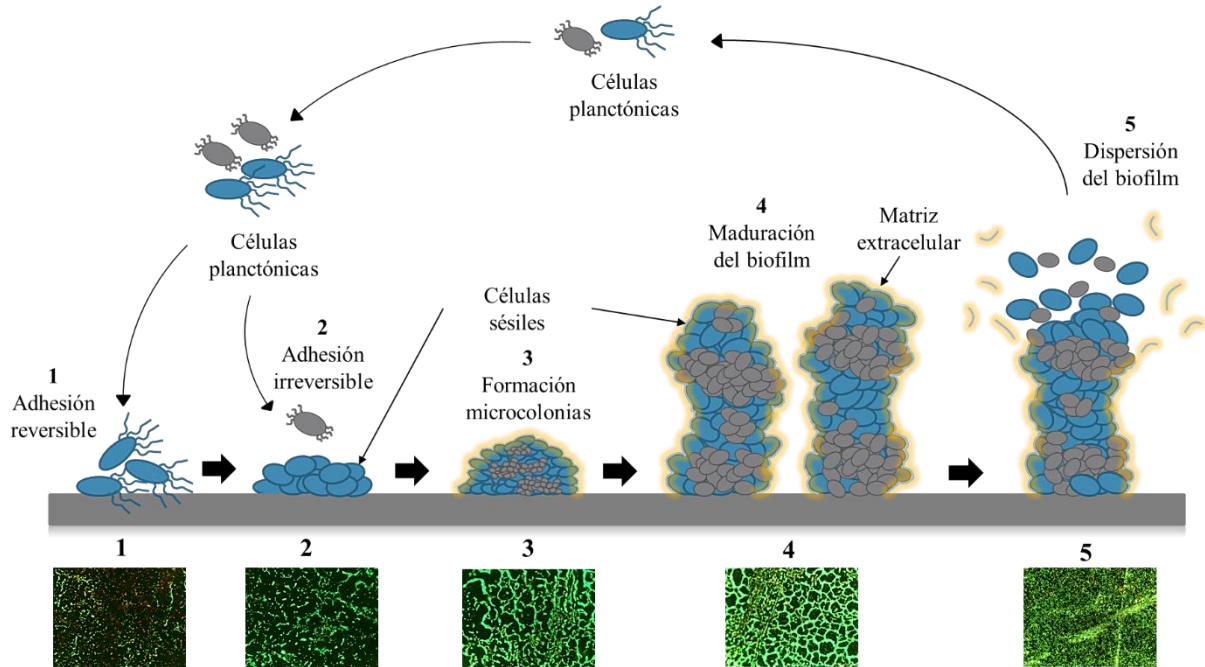


Figura 5. Representación de las diferentes etapas de formación de biofilms multiespecie. Las fotografías en la parte inferior obtenidas por microscopía de epifluorescencia directa corresponden a cada una de las cinco fases de desarrollo de biofilms de *L. monocytogenes*. Modificado de Ripolles-Avila (2018).

5.3.1 Unión reversible a la superficie

La adhesión inicial puede ser activa o pasiva, dependiendo de la motilidad o transporte gravitacional de las formas planctónicas (flotación libre) y difusión o fuerzas del fluido (Kumar y Anand, 1998). Las células bacterianas planctónicas se adhieren a una superficie mediante fuerzas físicas y/o apéndices como pueden ser los pili, fimbrias o flagelos. El tipo de superficie, la temperatura o la presión pueden modular este fenómeno de adhesión. Intervienen en este proceso la carga eléctrica de la superficie celular, las fuerzas de Van der Waals, la hidrofobicidad de la superficie, y las interacciones estéricas (o efecto de la orientación) y electroestáticas (Palmer, et al., 2007; Tribedi y Sil, 2013; Ukuku y Fett, 2006). Finalmente, se produce cuando las fuerzas de atracción superan a las repulsivas. En este sentido, las cargas negativas de la superficie de los microorganismos son repelidas por las cargas negativas de la mayoría de las superficies. Es aquí donde parece ser que los apéndices

bacterianos ejercen un papel mayor y consolidan la interacción entre microorganismo y superficie (Kumar y Anand, 1998). Esta adhesión depende de las propiedades fisicoquímicas de la célula bacteriana y de la superficie a la que se une como la textura, estado, carga eléctrica de la superficie, capacidad por donar o recibir electrones, hidrofobicidad, pH, temperatura o disponibilidad de nutrientes (Donlan, 2002). Al principio, las primeras células adheridas producen poco EPS lo que les permite mantener un movimiento independiente (O'Toole y Kolter, 1998). En esta etapa, la adhesión es reversible hasta que los microorganismos se diferencian, es decir, desencadenan cambios morfológicos. Las células pueden aun desprenderse y volver a la forma planctónica (Stoodley et al., 2002).

5.3.2 Unión irreversible

En esta siguiente etapa, la unión inicial reversible de algunas células se convierte en irreversible. Se produce un cambio al pasar de una interacción débil a una unión permanente con la producción del EPS. La matriz extracelular de polisacáridos estabiliza el biofilm. El EPS generado por los biofilms consiste en polisacáridos, proteínas, capa superficial de glicoproteínas y glucolípidos, así como ADN extracelular, iones metálicos, cationes divalentes y componentes activos de superficie (Jahid y Ha, 2012). Al alcanzar esta fase, se requieren ya fuerzas físicas o químicas mayores para romper esta unión como podrían ser tratamientos enzimáticos, detergentes, desinfectantes, surfactantes y/o calor (Stoodley et al., 2002). Se genera además una adhesión intercelular que une las células entre sí facilitando la formación de microcolonias y maduración del biofilm. Cuando las bacterias se fijan sobre una superficie, empiezan a comunicarse entre ellas, liberando moléculas de *quorum sensing* (QS) y multiplicándose. Alcanzado un determinado nivel de estas moléculas, las señales ambientales estimulan la producción de EPS y la multiplicación dentro de esta matriz, así como la formación de microcolonias. Las bacterias comunican entre sí produciendo señales que activan la expresión de genes considerados biofilm-específicos (Davies et al., 1998; Sperandio et al., 2003). El *quorum sensing* (o autoinducción) es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular. Las células involucradas producen y excretan sustancias, llamadas autoinductores, que sirven de señal química para inducir la expresión genética colectiva. Es una forma de comunicación celular (Parsek y Greenberg, 2005). Hasta ahora, se han identificado cuatro tipos de sistemas de QS que controlan la formación de biopelículas. Las bacterias Gram negativas poseen el

autoinductor-1 que secreta lactonas N-acil homoserina y autoinductor-3 mientras que las bacterias Gram positivas producen oligopéptidos autoinductores. Existen también otros tipos de vías de señalización para la comunicación intraespecífica. Ambos tipos de microorganismos expresan moléculas de autoinductor-2 o diéster de furanosil borato para comunicar entre especies (Miller y Blassler, 2001; Sperandio et al., 2003). Como resultado del *quorum sensing*, parece ser que se reclutan cada vez más células planctónicas para formar parte de las microcolonias. También participa en la comunicación y la estabilidad el ADN extracelular. Este último estabiliza el biofilm en fases iniciales, cuando todavía no se ha producido mucho EPS, ya que se ha visto que los biofilms no maduros son sensibles a las DNAsas (Whitchurch et al., 2002). Dubey y Ben-yehuda (2011) identificaron además un tipo de comunicación bacteriana mediada por nanotubos que unían células vecinas. Utilizando *Bacillus subtilis* como modelo, visualizaron la transferencia de moléculas citoplásmicas fluorescentes entre células adyacentes. Además, al cultivar cepas que albergaban genes de resistencia a antibióticos, demostraron que este intercambio molecular permitía que las células adquirieran transitoriamente una resistencia no hereditaria. Estos nanotubos también se formaron entre *B. subtilis* y *S. aureus*, e incluso entre *B. subtilis* y *E. coli*, dos especies distantes a nivel evolutivo. En esta etapa, el biofilm pasa a ser multicapa, con un grosor de hasta 10 μm (Gupta et al., 2016). Los análisis de las biopelículas han revelado que la formación de EPS provoca que la mayoría de las bacterias frenen la formación de flagelos, pili y fimbrias, y se centren en la maduración de las estructuras (Davey y O'Toole, 2000).

5.3.3 Formación de microcolonias

Se acumulan y se multiplican los microorganismos, siempre asociado a una producción de EPS (Chmielewski y Frank, 2003) que refuerza la unión entre el sustrato y las bacterias protegiendo a la comunidad de cualquier estrés ambiental (Donlan, 2002). Las microcolonias pueden ser muy beneficiosas porque permiten intercambios de sustratos entre especies y la eliminación mutua de productos finales del metabolismo. La microcolonia crece y puede alcanzar hasta los 100 μm . Estas estructuras están formadas, muchas veces, por comunidades bacterianas diversas. Estos microconsorcios multiespecie funcionan de manera relativamente compleja y coordinada. Su elevada proximidad favorece el intercambio de sustancias, distribución de productos metabólicos y eliminación de sustancias tóxicas. Por

ejemplo, la degradación de materia orgánica compleja en metano y dióxido de carbono durante la digestión anaeróbica requiere la participación de al menos tres tipos de bacterias. Las bacterias fermentativas inician el catabolismo de compuestos orgánicos complejos y producen ácidos y alcoholes a partir de éstos. Estos sustratos son luego consumidos por bacterias acetogénicas. Las que son metanógenas obtienen energía al convertir el acetato, dióxido de carbono e hidrógeno a metano. Los biofilms ofrecen un ambiente perfecto para el establecimiento de una asociación sintrófica. El sintrofismo es un tipo de simbiosis en el que dos bacterias metabólicamente distintas dependen una de la otra para utilizar ciertos sustratos como fuentes de energía (Davey y O'Toole, 2000). Se cree incluso que, en función de las condiciones ambientales, las bacterias aprovechan diversas rutas para la formación de biofilms (Pratt y Kolter, 1999; Techaruvichit et al., 2016). En esta etapa, el biofilm se adapta a las condiciones externas mediante modificaciones en su estructura, fisiología y metabolismo (Gupta et al., 2016).

5.3.4 Maduración

Etapa en la que se desarrolla una estructura organizada que puede ser plana o en forma de seta dependiendo de la fuente de nutrientes (Chmielewski y Frank, 2003). Para obtener una madurez estructural, se requieren desde siete días (Ripolles-Avila et al., 2018a) hasta unos diez días o más (Stoodley et al., 2002), dependiendo del microorganismo y las condiciones ambientales. Múltiples análisis de biofilms muestran que la formación de EPS frena la producción de flagelos, fimbrias y pili para la mayoría de bacterias focalizando así su actividad en la maduración del biofilm (Stoodley et al., 2002). Las bacterias crecen en estado sésil dentro de microcolonias complejas, cerradas y heterogéneas en las que discurren canales de agua y nutrientes (Davey y O'Toole, 2000; Stoodley et al., 2002). Si las condiciones son favorables, la etapa final de la formación de estas estructuras es la maduración, en la que las comunidades desarrollan una estructura autoorganizada en un microentorno (Sauer et al., 2002).

5.3.5 Dispersión

La quinta etapa es la dispersión que marca el desprendimiento del biofilm y el retorno de las células al estado planctónico (Sauer et al., 2002). Las posibles causas de esta etapa de

desprendimiento por parte del biofilm son: i) determinadas perturbaciones externas como los flujos turbulentos, la falta de nutrientes, cambios en el carácter de la superficie y/o fuerzas físicas del producto; y ii) procesos de naturaleza interna del biofilm como la degradación enzimática endógena, la liberación de EPS y/o de proteínas de unión a superficie, determinadas moléculas de QS (Hunt et al., 2004; Kaplan, 2010; Mai-Prochnow et al., 2006). No obstante, este desprendimiento parece ser un proceso activo que permite la colonización de nuevos nichos (Sauer et al., 2002). Finalmente, en esta etapa, el biofilm se propaga y coloniza nuevas superficies. En esta fase, la comunidad microbiana dentro de la estructura produce diferentes enzimas sacarolíticas que rompen los polisacáridos estabilizadores de la biopelícula y, por lo tanto, liberan bacterias de la superficie que residen en la parte superior de la estructura para la colonización de una nueva superficie. Por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* y *P. aeruginosa* liberan alginato liasa, *E. coli* libera N-acetil-heparosan liasa y *Streptococcus equi* produce enzimas hialuronidasas para la degradación de la matriz de biofilm (Sutherland, 1999). Los microorganismos aumentan la expresión de las proteínas de los flagelos para que las bacterias se vuelvan móviles y puedan translocarse a un nuevo lugar.

5.4 Impacto de los biofilms y las contaminaciones cruzadas

La contaminación microbiana de las superficies es uno de los mayores factores de persistencia en los entornos de procesamiento de alimentos y se cree que tiene un impacto significativo sobre la salud pública (Bridier et al., 2015). *B. cereus*, *E. coli*, *Shigella* spp. y *S. aureus* han sido detectados en forma de biofilms en industrias lácticas y de producción de huevos, y se han aislado también *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. y *Vibrio* spp. de superficies de equipos industriales de plantas de procesamiento de productos del mar (Bagge-Ravn et al. 2003a). Los biofilms están involucrados en más del 65 % de las enfermedades de transmisión alimentaria según el *US National Health Institute* (NIH) y el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Está actualmente bien documentado que los patógenos alimentarios pueden producir biofilms sobre productos, lo que los convierte en la principal causa de aparición de brotes. Además, como se ha mencionado anteriormente, múltiples estudios han demostrado que los biofilms pueden ser resistentes a los procesos de limpieza y desinfección comúnmente usados (Jahid y Ha, 2012). Wang et al. (2013) destacaron el potencial riesgo de contaminación cruzada por biofilms en el sector alimentario

y la necesidad de una mayor atención a las prácticas de desinfección adecuadas en las instalaciones de procesamiento de alimentos.

6. Métodos para la detección y cuantificación de los biofilms

6.1 Detección y muestreo de superficies

Para empezar, según Ripolles-Avila et al. (2018c), BioFinder es una herramienta para detectar de una forma visual e inmediata la localización de biofilms en una industria alimentaria. El producto se pulveriza sobre las áreas que se quieran controlar y se produce una espuma blanca (en contraste con el color naranja del producto) si la reacción es positiva, es decir, si se detecta la presencia de un biofilm. El cambio de color y burbujeo es claramente visible, permitiendo tomar, sin lugar a duda, las medidas correctoras correspondientes cuando sea necesario. Este producto se ha diseñado en base a la reacción de la enzima catalasa, que se encuentra en la mayoría de los microorganismos y, a su vez, biofilms. En las industrias, como mencionado anteriormente, los biofilms están generalmente formados por múltiples especies. Aunque hubiera microorganismos catalasa negativos, lo más probable es que aun así se consiga detectar el biofilm debido a las otras especies que lo conformarían, ellas sí, catalasas positivas como podrían ser *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* y *S. enterica* ser. Typhimurium, así como otras bacterias presentes en el ambiente. BioFinder es capaz de detectar estos patógenos a partir de una carga de 10^4 UFC/cm². Los resultados obtenidos demuestran la aplicabilidad de este biodetector para la industria alimentaria, como herramienta para comprobar el estado higiénico de las superficies.

La determinación del trifosfato de adenosina (ATP) por bioluminiscencia es otro método que permite evaluar al instante la higiene de la superficie (Fung, 2002). El ATP, como ya se conoce, actúa como fuente de energía primaria en todos los organismos y es, por lo tanto, un marcador principal para la viabilidad. La bioluminiscencia se refiere al proceso mediante el cual los organismos convierten la energía química en luz. Para esta prueba, se recurre concretamente a la enzima luciferasa. Se produce una reacción en la que se emite luz de forma proporcional a la cantidad de ATP presente, es decir, de biofilm. El límite de detección de este método es el mismo que para BioFinder (10^4 UFC/cm²) (Corbitt et al., 2000). No obstante, no parece ser la mejor alternativa para detectar biofilms maduros (Lorenzo-Cartón

et al., 2011) ya que el ensayo es altamente preciso a niveles bajos de ATP (Wilson et al., 2017).

Para llevar a cabo el control de la contaminación microbiológica de las superficies, se ha utilizado tradicionalmente, hisopos y/o esponjas, pero el problema es que estas herramientas no son capaces de recuperar todos los microorganismos y menos si éstos están en forma de biofilms (Fratamico et al., 2009).

Una opción para monitorizar la evolución de la contaminación de las superficies consiste en implantar unos sensores de superficie llamados sensores SCH (*Sensor Control Hygiene*). Éstos se adhieren o sueldan a las áreas de la industria alimentaria de las que se quiera hacer el seguimiento. Los sensores permanecen allí el tiempo deseado contaminándose igual que el resto de las superficies que los rodean. Este sistema permite una monitorización muy fiable del estado de las superficies ya que es como si se retirara físicamente cada determinado lapso un fragmento de éstas. Una vez se recogen estos sensores, se sumergen en una solución de extracción y se provoca una agitación con las perlas de vidrio o por sonicación para desprender los microorganismos adheridos a la superficie (Fijan y Šostar-Turk, 2010; Gerba y Kennedy, 2007; Traoré et al., 2002). Las elevadas fuerzas de fricción asociadas a la fuerte agitación con perlas de vidrio hacen que los microorganismos se liberen completamente de la superficie a la que estaban unidos (Lindsay y von Holy, 1997), lográndose un desprendimiento efectivo. Los sensores SCH representan una alternativa de fácil ejecución, de bajo coste y que aporta mucha información al equipo que realiza el seguimiento de la contaminación microbiológica en todo tipo de superficies. De hecho, estos sensores ya están siendo empleados en aplicación real para realizar estudios de evolución microbiana. En este sentido, Ripolles-Avila et al. (2019) realizaron, durante 74 semanas, un seguimiento completo de la contaminación de trece áreas de dos plantas de procesado cárnico con estos sensores SCH.

Se ha dado mucha importancia al desarrollo de nuevos métodos para detectar biofilms en ambientes industriales. Existen otros tipos de sensores como, por ejemplo, los sensores térmicos. Con estos dispositivos, se mide la conductividad térmica local y las variaciones de calor asociados a la formación de un biofilm. Estos sistemas son capaces de detectar depósitos de unos pocos micrómetros de grosor (Galié et al., 2018).

6.2 Cuantificación

Hay a disposición de las industrias una multitud de métodos para cuantificar la contaminación de las superficies (**Tabla 5**), no obstante, todos presentan ventajas e inconvenientes.

Tabla 5. Principales métodos disponibles para la cuantificación de los biofilms tanto para hacer el seguimiento del estado higiénico de las superficies de una industria alimentaria como para cuantificar biofilms generados *in vitro*. Elaboración propia.

Métodos	Descripción	Referencia
Recuento en placa	Método estándar de cuantificación que se utiliza para determinar el número de células viables (UFC/ml).	Wilson et al. (2017)
Placas de contacto o laminocultivos	Se emplea una placa o lámina de agar estéril que se presiona sobre la superficie durante 5 a 10 segundos para que el agar entre en contacto con el área a evaluar.	Fratamico et al. (2009)
Sistema TEMPO (validado por AFNOR)	Recuento automatizado, basado en la técnica del Número Más Probable con viales, que contienen un indicador fluorescente y un medio de cultivo específico y tarjetas que contienen 16 tubos para las diluciones.	AFNOR (2005)
Citometría de flujo	Las células suspendidas en un fluido atraviesan un tubo sobre el que incide luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células se recoge mediante equipos de detección.	Fratamico et al. (2009)
Microscopía de luz y fluorescencia	El recuento celular y la caracterización 3D de biopelículas se pueden realizar mediante varios métodos de microscopía que van desde la microscopía de luz simple a la epifluorescencia.	Azeredo et al. (2017)
Microscopía láser de barrido confocal	Produce imágenes nítidas y de alta resolución de biopelículas en tres dimensiones, mediciones de volumen y morfología de las biopelículas.	
Colorantes y proteínas fluorescentes	Los tintes fluorescentes utilizan fluoróforos que absorben y emiten luz cuando se incorporan a estructuras biológicas. La luz emitida se detecta y se generan imágenes de la biopelícula.	Petty (2007)
PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>): PCR en tiempo real (RT-PCR) o PCR cuantitativa (qPCR)	Basado en la relación directa entre concentración de ADN diana y cantidad de producto de la PCR generado por la amplificación. Acoplado a fluorescencia, hace que se emita una señal proporcional a la cantidad de producto de PCR generado en cada ciclo de reacción sucesivo.	Salas-Vázquez (2007)

Para que el uso de algunas de las precedentes técnicas pueda ser viable, se debe tener en cuenta qué información proporciona el método en cuestión, el coste no sólo a nivel económico sino también de tiempo y personal necesario, fiabilidad y representatividad de los resultados. Para empezar, los recuentos tradicionales en placa son de muy fácil realización, pero requieren tiempo y el factor humano puede ser fuente de errores tanto en la realización de las diluciones como en el recuento. Las placas de contacto o laminocultivos no pueden utilizarse para grietas, superficies curvas e irregulares, áreas de difícil acceso o

zonas muy contaminadas. Uno de los inconvenientes de este método es que los resultados pueden variar en función de la presión aplicada y el tiempo de contacto. Este tipo de placas tiene además tendencia a subestimar el recuento cuando la contaminación es alta (Fratamico et al., 2009) y la fuerza ejercida por la presión de la placa no es capaz de desprender el biofilm (Salas-Vázquez, 2007).

Según Li et al. (2017), los métodos de cuantificación usados convencionalmente en los laboratorios como, por ejemplo, las placas de agar, RT-PCR o amplificaciones de ADN no son ideales para el ámbito industrial debido a: i) la presencia de células viables, pero no cultivables en biofilms (placas de agar); ii) tiempo necesario hasta obtener resultados, poco compatibles con un sistema en el que se debe actuar rápidamente en caso de incidencia (placas de agar); y iii) elevado coste de los reactivos y equipos (en el caso de RT-PCR y amplificaciones de ADN). El tiempo de incubación de las tarjetas del sistema TEMPO y las placas de agar convencionales es el mismo, pero al trabajar con TEMPO, generalmente son necesarias menos diluciones ya que el límite de recuento (4.900 UFC/g o ml) es mucho más alto, ahorrando así manipulación. Además, al ser un método de recuento automatizado, permite obtener resultados estandarizados y se limitan los errores inducidos por el operador (Katase y Tsumura, 2011).

Continuando con la valoración de los métodos disponibles, uno de los principales inconvenientes de los colorantes y proteínas fluorescentes es el potencial tóxico de estos compuestos y su posible interferencia en los procesos celulares alterando así su posterior caracterización. Sin embargo, los colorantes permiten obtener más información valiosa sobre ciertas características del biofilm, como su forma y viabilidad celular espacial. La citometría de flujo permite también determinar tamaño y complejidad de las células. Es un procedimiento fácil, pero se debe resaltar en este caso el considerable coste del equipo.

Una ventaja importante de la microscopía es la capacidad de analizar cuantitativamente los biofilms sin la necesidad de recolección y resuspensión, manteniendo así las estructuras naturales. El uso de tintes y fluorescencia permite obtener más información sobre la viabilidad celular espacial, temporal y la función sin destrucción de la estructura. Desafortunadamente, la selección de imágenes está sujeta a sesgos, aunque se pueden tomar medidas para controlarlo. La selección aleatoria de imágenes o la selección consistente de la ubicación de la imagen entre múltiples muestras son dos técnicas comúnmente utilizadas (Wilson et al., 2017).

Existen muchos otros métodos para cuantificar los microorganismos presentes en un biofilm. Se presentan a continuación otros métodos para cuantificar estas estructuras (**Tabla 6**).

Tabla 6. Métodos alternativos para cuantificar biofilms. Extraído y modificado de Wilson et al. (2017).

Métodos alternativos	Descripción
Determinación de la masa seca (MS)	Se coloca la muestra en un horno a una temperatura constante hasta que se elimina el agua y se alcanza un peso invariable.
Carbón orgánico total	Se mide la cantidad de carbono de una muestra ya que está relacionada con la presencia de compuestos orgánicos o compuestos de carbono derivados de seres vivos (proteínas, lípidos, urea, etc.).
Determinación de la proteína total	Se extrae y se mide el contenido total de proteína, proporcional al crecimiento total de biofilm. El contenido en proteína se correlaciona con el número de células presente en el biofilm.
Tinción de cristal violeta	Consiste en teñir los biofilms con cristal violeta, recuperar el colorante unido y medir su absorbancia mediante espectrofotometría.
Ensayos metabólicos (por ejemplo, sales de tetrazolio)	La base de estos ensayos es la conversión de un sustrato específico, por actividad metabólica celular, en un producto coloreado, que se puede medir por espectrofotometría. Las sales de tetrazolio permiten cuantificar y visualizar la viabilidad celular y medir la actividad metabólica.
Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)	Permite la medición no destructiva de la acumulación de biopelículas en función del tiempo. El dispositivo capta la adhesión de bacterias al cristal de cuarzo ya que provoca una vibración de dicha superficie.

Una de las principales desventajas de las mediciones de MS es que no diferencian la masa celular de diferentes componentes de la estructura, como la matriz extracelular. El uso de este método también depende del sustrato de crecimiento, ya que debe ser resistente al calor (temperatura de secado) o separarse fácilmente de la biopelícula, por lo que no se incluye en el cálculo de la biomasa. Otra desventaja de este método es que la muestra no se puede usar para ningún otro ensayo de caracterización después del secado. Las principales ventajas de esta metodología son la relativa facilidad y la rentabilidad, ya que requiere equipos de laboratorio relativamente “de baja tecnología”, como un horno de secado y una balanza, que son equipos de laboratorio estándares.

Determinar el carbono orgánico total requiere de un equipo especializado (TOC), lo que supone un elevado coste analítico. Al igual que para la medición de la MS, otro inconveniente es la falta de especificidad en la cuantificación, ya que el TOC mide el contenido de carbono de toda la biopelícula, incluidas las bacterias y EPS. Aunque el TOC proporciona un marcador para cuantificar la cantidad de biofilm presente, este valor debe correlacionarse utilizando un método de análisis directo (UFC, conteo de células, etc.) para generar un valor independiente del método. Además, se ha demostrado que la cantidad de

carbono en un volumen dado de células depende del estado de viabilidad de las bacterias. Por lo tanto, se deben realizar correlaciones adicionales en cada conjunto de condiciones y se debe ejecutar un nuevo protocolo de estandarización, o control, cada vez que se realiza el experimento. La variabilidad de producción de proteínas entre especies, estado de maduración y cultivo puede resultar en una desviación de la correlación directa con el número de células, lo que hace que este sea un método que se utilice junto con controles experimentales estrictos y se verifique con métodos de cuantificación más directos (Wilson et al., 2017).

La prueba del cristal violeta ha demostrado ser válida para estimar el crecimiento de biofilms y es, de hecho, uno de los ensayos más utilizados en placas *microtiter* (Ripolles-Avila et al., 2018b). Si bien el ensayo consta de varios pasos, es relativamente fácil de realizar, reproducible y permite a los investigadores analizar rápidamente múltiples muestras simultáneamente. Es relativamente económico ya que no requiere la compra de equipo especializado y el tinte es accesible con una vida útil de años si está protegido de una posible contaminación. No obstante, es un método que también presenta una serie de desventajas, entre las que se destaca que no es capaz de discriminar células viables de células que no lo son, dando tan solo una idea de la biomasa total producida.

La principal ventaja de la QCM es el monitoreo de la acumulación de masa con una precisión de ng/cm^2 en tiempo real sin sacrificar la muestra, lo que ha ayudado a comprender mejor la formación de los biofilms. Además, otra característica interesante es que se puede usar en acero inoxidable, cobre, PVC, vidrio y otros materiales de superficie industrial (Fratamico et al., 2009). Una de las principales desventajas de este método es el coste del equipo especializado, la electrónica, el software y los consumibles (Pereira et al., 2008).

7. Eliminación de los biofilms

Junto con estos métodos de detección clásicos o más novedosos, se deben desarrollar nuevas estrategias para prevenir la formación de biofilms, o una vez que están instaurados, eliminarlos y que eviten que las bacterias creen resistencia a los desinfectantes en entornos de procesamiento de alimentos (Gopal et al., 2015). Hoy en día se utilizan varios métodos físicos (como vapor caliente, ultrasonidos) y compuestos químicos (como hipoclorito de sodio, soluciones de hidróxido de sodio, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, etc.) para

controlar la presencia de biofilms en la industria alimentaria, incluso dentro de las tuberías y en superficies de trabajo (Galié et al., 2018; Srey et al., 2013).

Las siguientes secciones describirán los métodos más importantes para el control de la formación de biopelículas en la industria alimentaria, incluidas algunas estrategias novedosas como bacteriófagos, bacteriocinas, inhibidores del *quorum sensing* y aceites esenciales.

Es importante tener presente que la primera etapa de cualquier protocolo de higienización es la limpieza, operación donde se elimina la suciedad previniendo la acumulación de residuos que puedan potenciar el crecimiento de microorganismos. Se debe tener cuidado de no dejar productos residuales después de esta etapa, ya que podrían inactivar la posterior desinfección (Fontecha-Umaña, 2014).

La desinfección, sin embargo, consiste en el tratamiento de las superficies y equipos utilizando medios físicos o químicos, para la eliminación total de patógenos y reducir la cantidad de microorganismos presentes a un nivel seguro y/o prevenir el desarrollo microbiano en la superficie durante el periodo de producción, evitando así su transferencia al consumidor. Se debe asegurar el contacto entre químicos y microorganismos. La finalidad de las operaciones de limpieza es justamente hacer accesible el desinfectante a los microorganismos. Existen factores que pueden afectar la eficacia de este procedimiento como la presencia de materia orgánica, la temperatura, la carga microbiana, la población presente, la concentración y el tiempo de contacto. Como discutido anteriormente, una mala desinfección puede potenciar la aparición de resistencias a éstos. En España, para comercializar un desinfectante de superficies de contacto, éste tiene que superar la norma de referencia UNE-EN 13697 (AENOR, 2015), demostrando una reducción mínima de 5 log (UFC).

7.1 Tratamientos químicos

Se pueden utilizar múltiples desinfectantes químicos. Generalmente, su efecto para eliminar biofilms es dependiente de la concentración de uso y el tiempo con el que se aplica.

Los desinfectantes a base de cloro son los más utilizados en la industria alimentaria, no obstante, una vez más, se están registrando cada vez más resistencias. Por ejemplo, en *S. enterica*, la resistencia al cloro se correlacionó con su fenotipo de producción de celulosa.

Este fenotipo dependió de las condiciones de estrés ambiental encontradas en las plantas de procesado de alimentos (Yang et al., 2016). El ClO₂ acuoso es el desinfectante más utilizado en la industria alimentaria, aunque se ha demostrado que el ClO₂ gaseoso es más eficaz contra endosporas de *B. cereus* presentes en biofilms de superficies de acero inoxidable (Nam et al., 2014). El H₂O₂ es un potente desinfectante oxidante, ampliamente utilizado en este sector. Genera radicales libres que entran en contacto con las estructuras bacterianas y las destruye en concentraciones de 0,08 a 5 % sin efectos secundarios tóxicos. Su combinación con ácido acético genera ácido peracético, un oxidante fuerte con pH 2,8, que se utiliza, por ejemplo, en el tratamiento de tuberías de agua al 0,5 %, con elevada eficacia frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Srey et al., 2013). Además, se ha indicado que el hecho de emplear desinfectantes a base de H₂O₂ podría reducir las concentraciones de desinfectantes tradicionales, disminuyendo pues la resistencia que éstos producen, así como también reduciendo la liberación de residuos químicos derivados de su uso en el medio ambiente (Ríos-Castillo et al., 2017). El ozono es un gas tóxico que presenta también una potente actividad oxidante. Este último destruye diferentes tipos de microorganismos, incluso cuando se encuentran formando biofilms, virus y protozoos, rompiendo las envolturas celulares (Srey et al., 2013).

Los compuestos de amonio cuaternario son ampliamente utilizados como desinfectantes en la industria alimentaria, incluida la eliminación de biofilms. Estos compuestos solubles en agua, con carga positiva, rompen la membrana celular bacteriana, causando la lisis de las bacterias. Sin embargo, algunas cepas de *L. monocytogenes* aisladas de ambientes alimentarios albergan genes implicados en la resistencia a los desinfectantes de amonio cuaternario (*qacH* y *bcrABC*), que actúan como bombas para la secreción de estos compuestos (Møretro et al., 2017). En estos casos, un enfoque de lucha multifacético, usando una combinación de diferentes tratamientos, podría mejorar la eliminación de biofilms formados por bacterias resistentes (Galié et al., 2018; Techaruvichit et al., 2016).

7.2 Enzimas

Las enzimas se consideran una medida sostenible para la eliminación de biopelículas ya que son biodegradables y tienen baja toxicidad. Los componentes principales de la estructura de los biofilms están compuestos por macromoléculas orgánicas, principalmente proteínas y polisacáridos. Se utilizan, por lo tanto, proteasas (serina proteasas, proteinasa K, pepsina y

tripsina) y glicosidasas (amilasas, dextranasas y pectinasas) (Meireles et al., 2016). Otras enzimas como las amilasas, las celulasas, las liasas, las glicosidasas y las DNAsas han resultado ser también efectivas en la eliminación de estas estructuras de protección (Da Silva y De Martinis, 2013). Se ha descrito que la matriz que conforman los biofilms de *L. monocytogenes* está compuesta, principalmente, por proteínas (Combrouse et al., 2013; Colagiorgi et al., 2016). En este caso, un tratamiento enzimático con proteasas conseguiría degradar parcialmente la matriz y podría eliminarse así por completo mediante otros procedimientos (mecánicos, químicos, etc.). Los tratamientos enzimáticos hacen que los biofilms sean más sensibles a la posterior acción de los desinfectantes (Coughlan et al., 2016). Guerrero-Navarro et al. (2019) demostraron que una solución enzimática eliminaba el 78 % del *fouling* que podría generarse en una industria láctea *versus* el 72 % mediante productos alcalinos. La combinación de enzimas con diferentes actividades, así como con otros tratamientos químicos (desinfectantes) o físicos (ultrasonidos) mejoraron la eliminación de biofilms de diferentes especies como *E. coli* o *Bacillus* spp. (Meireles et al., 2016).

7.3 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son compuestos naturales producidos por bacterias, mohos y levaduras con una superficie activa que les confiere múltiples propiedades. Existe una gran variedad a nivel de composición química ya que pueden ser glicopéptidos, lipopéptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, entre otros y, a su vez, los efectos asociados son muy diversos, resaltando entre ellos la capacidad de emulsificación, dispersión, solubilización, antimicrobiano y/o antibiofilm. Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas, que contienen a la vez áreas hidrófilas e hidrófobas. Tienden a acumularse en las interfaces al reducir la tensión superficial (gas-líquido) e interfacial (líquido-líquido o sólido-líquido), reduciendo las fuerzas repulsivas entre dos fases diferentes y permitiendo que las diferentes fases se mezclen e interactúen. Modifican las características hidrofóbicas de la superficie bacteriana alterando la adhesión a ésta. Como las enzimas, son una herramienta sostenible, no tóxica, biodegradable, fácil de producir y de coste asequible. Un ejemplo de biosurfactante es la liquenisina, un lipopéptido producido por *Bacillus licheniformis*. Las superficies de la industria alimentaria pueden tratarse con este biosurfactante, que puede disminuir la unión de microorganismos tales como *S. aureus* resistente a meticilina, *Candida*

albicans, *Y. enterocolitica* (Coronel-León et al., 2015). Fengicina, iturina y surfactina son también lipopéptidos similares producido por *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. subtilis* en el caso de surfactina). Todos estos compuestos actúan sobre la superficie del microorganismo objetivo, alterando su capacidad de unión al disminuir la tensión superficial. Estas moléculas se insertan en las membranas celulares microbianas, o cationes quelantes. Este efecto altera la permeabilidad de la membrana y, finalmente, conduce a la muerte celular (Wang et al., 2016).

7.4 Bacteriófagos

Según Galié et al., 2018, la actividad antimicrobiana llevada a cabo por los bacteriófagos es inocua para los humanos, animales y plantas debido a que su acción es específica contra células procariotas. No obstante, otros autores discrepan sobre su total seguridad (Gutiérrez et al., 2016). Estos agentes antibiofilm prometedores ya han dado lugar a aplicaciones comerciales. Por ejemplo, *Listeria phage P100* se produjo para eliminar las biopelículas presentes en los productos cárnicos elaborados y en las superficies de trabajo de las industrias de procesado (Montañez-Izquierdo et al., 2012). Otras especies de patógenos han sido atacadas con bacteriófagos comerciales, como por ejemplo *S. enterica* o *E. coli* (Gutiérrez et al., 2016). La principal limitación de los tratamientos con fagos es su capacidad para acceder y atacar las células bacterianas dentro del biofilm, debido a la intrincada estructura que poseen estas comunidades y la presencia de material extracelular, que actúa como un obstáculo físico. Sin embargo, algunos fagos poseen depolimerasas, una excelente solución para este problema de difusión. La presencia de estas enzimas mejora el proceso de invasión y dispersión de fagos a través de la biopelícula en tratamiento (Parasion et al., 2014). Otras dificultades que deben abordarse antes de su plena implementación en la industria alimentaria son las complicaciones técnicas relacionadas con su fabricación, como su escalamiento durante la propagación, así como la purificación de fagos y, en la UE, la norma reguladora de la EFSA (Gutiérrez et al., 2016). De hecho, según Briandet et al. (2008), las biopelículas pueden actuar como reservorios de fagos activos. Un ecosistema natural, como un biofilm de múltiples especies compuesto por cepas resistentes y/o sensibles a fagos, constituye un reservorio de fagos que no sólo puede atrapar y amplificar partículas virales y protegerlas de los procedimientos de desecación o desinfección, sino también permite la posterior diseminación de fagos. Este hallazgo explica la persistencia de fagos lactocócicos en industrias lácteas que impiden la actividad de las bacterias del ácido láctico.

7.5 Bacteriocinas

El uso de bacteriocinas en la industria alimentaria es útil para prevenir la formación de biofilms en diferentes superficies. Estos agentes antimicrobianos también pueden: i) extender la fecha de caducidad de un alimento dado; ii) reducir el deterioro de los alimentos; iii) prevenir la transmisión de patógenos por los alimentos; iv) disminuir las concentraciones de conservantes químicos; y v) reducir el número de tratamientos térmicos. Por ejemplo, la nisina, un péptido aislado de *Lactococcus lactis*, segura para animales y humanos, pulverizada en las superficies, puede prevenir la adhesión y la formación de biofilms de *L. monocytogenes* (García-Almendárez et al., 2008). Otras bacteriocinas han sido ampliamente investigadas para prevenir la colonización bacteriana, especialmente las producidas por bacterias del ácido láctico. Algunas de estas nuevas bacteriocinas son pediocinas (activas contra *L. monocytogenes* y producidas por *Enterococcus* spp.), lactocinas (activas contra *Brochothrix thermosphacta* y producidas por *Lactococcus* spp.) y garvicina (activas contra cepas patógenas de *Lactococcus garvieae* y producidas por esta especie) (Castellano et al., 2017).

7.6 Inhibición del *quorum sensing*

El *quorum sensing*, como indicado anteriormente, es utilizado por las bacterias para regular la expresión génica en respuesta a altas concentraciones ambientales de pequeñas moléculas de señalización (lactonas de acil-homoserina, péptidos y el autoinductor-2). Estos mecanismos regulados por QS incluyen genes involucrados en la formación de biopelículas (Parsek y Greenberg, 2005). Una de las estrategias de prevención de formación de biofilms es, por lo tanto, los inhibidores de este proceso (Coughlan et al., 2016) fundamental para el desarrollo y la maduración de biofilms como, por ejemplo, los de *L. monocytogenes* (Da Silva y De Martinis, 2013). Los inhibidores de QS representan una nueva generación de agentes antimicrobianos, ya que actúan principalmente apagando a los mediadores del sistema QS. A diferencia de las estrategias bactericidas (químicas), estos compuestos causan menos presión de selección y, por lo tanto, no favorecen la aparición de resistencias. Existen diferentes estrategias para interferir con el QS bacteriano: i) unión competitiva de inhibidores a los receptores QS, ii) degradación enzimática de señales del QS (*quorum quenching*), iii) control postranscripcional de genes del QS mediante sRNAs (*small RNAs*), y iv) inhibición de señales de biosíntesis de QS (Galié et al., 2018). Las paraoxonasas son un tipo de enzimas que destruyen determinadas señales del QS. Estas enzimas causan la

hidrólisis del anillo de lactona de la N-acil-homoserina lactona, una molécula señalizadora importante en el caso de *P. aeruginosa* (Yang et al., 2005). Existen entonces muchas opciones y las fuentes de estos inhibidores del QS son también muy variadas (furanonas halogenadas de algas rojas, disulfidos del ajo, furocumarinas del pomelo, polifenoles del té, ácidos orgánicos como el ácido láctico, etc.) (Galié et al., 2018).

7.7 Aceites esenciales

Varios compuestos derivados de plantas han demostrado tener propiedades antibiofilm. Una ventaja útil relacionada con el uso de estos compuestos como agentes potenciales a la eliminación de biofilms es la percepción positiva que los consumidores tienen de ellos, en contraste con los desinfectantes de síntesis química, especialmente en las aplicaciones de la industria alimentaria. Un aceite esencial o aceite etéreo refiere a metabolitos secundarios de las plantas, lipofílicos y altamente volátiles. El aceite esencial de orégano, carvacrol y timol es capaz de eliminar los biofilms incipientes (24 horas de incubación) de *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Nostro et al., 2007). Otro ejemplo sería el aceite esencial de tomillo constituido principalmente por p-cimeno, timol, γ -terpineno y 1,8-cineol, que son capaces de inhibir el crecimiento de *B. cereus* planctónico y en forma de biofilm (Kang et al., 2018).

7.8 Carga microbiana final después de los tratamientos de eliminación

Finalmente, todo el proceso de higienización (limpieza, desinfección, enjuague y secado), complementado con los métodos de control y cuantificación que se consideren convenientes, apuntan a reducir el número de bacterias residentes a un nivel que sea compatible con la producción de alimentos seguros y que cumplan con la vida útil esperada de los productos. Las investigaciones han indicado que, en la mayoría de los casos, se puede lograr un nivel de contaminación de menos de 2,5 UFC/cm² después de procesos de limpieza y desinfección regulares. Este nivel está de acuerdo con la mayoría de las normas más aceptadas (Møretro y Langsrud, 2017). La CE sugirió también un rango aceptable de 0 a 10 UFC/cm², en sus normas, para los establecimientos de producción de carne de aves en 2001 (European Commission, 2001). Sin embargo, se debe tener en cuenta que, aunque existan estas recomendaciones, no hay ningún límite de aceptabilidad general fijado por los Reglamentos relacionados con la higiene de las industrias alimentarias. Tampoco se establecerán en un

futuro porque este enfoque se considera obsoleto, ya que la vigilancia de la higiene debe basarse en el riesgo. Como mínimo, el proceso de limpieza y desinfección debe diseñarse para obtener una reducción bacteriana que sea igual a la que se acumula diariamente (debido a la contaminación y multiplicación de los microorganismos) y para eliminar los patógenos que se introducen en el entorno de producción.

8. Microbiota residente en industrias cárnicas

A pesar de todos los esfuerzos por eliminar los microorganismos presentes en las superficies de las industrias alimentarias, determinadas comunidades microbianas son capaces de persistir en ellas formando lo que se conoce como la microbiota residente. En las superficies de las instalaciones alimentarias, en general, dominan las bacterias Gram negativas no patogénicas como *Pseudomonas* spp., en menor proporción se encuentran también especies de la familia *Enterobacteriaceae* y *Acinetobacter* spp. (Tabla 7). La persistencia de *Pseudomonas* spp. puede explicarse por su capacidad de crecer a bajas temperaturas, formar biofilms, tolerar biocidas, además de sus escasas exigencias en cuanto a requisitos de crecimiento en general. Las bacterias Gram positivas, en cambio, tienden a predominar en industrias del sector lácteo y/o ambientes húmedos (Møretro y Langsrud, 2017).

Tabla 7. Microbiota residente en industrias cárnicas. Modificado de Møretro y Langsrud (2017).

Entorno estudiado	Resultados	Referencia	
Planta de procesado	<i>Pseudomonas, Aeromonas/ Shewanella, Bacillus/Paenibacillus</i>	Presencia	Hood y Zottola (1997)
	<i>Hafnia, Citrobacter, Klebsiella</i>	Más del 10 %	
Planta de procesado	<i>Pseudomonas</i>	Predominante	Mettler y Carpentier (1998)
	Enterobacterias: <i>Enterobacter, Kluyvera</i>	Más del 10 %	
Planta de procesado y cinta transportadora	<i>Staphylococcus</i> , levaduras	Presencia	Brightwell et al. (2006)
	<i>Pseudomonas</i>	Predominante	
Planta de procesado	<i>Microbacterium, Serratia, Sphingomonas</i> y Alphaproteobacteria	Más del 10 %	Marouani-Gadri et al. (2009)
	<i>Staphylococcus</i>	Predominante	
	<i>Bacillus/Paenibacillus</i>	Más del 20 %	
	<i>Micrococcus</i> ; enterobacterias: <i>Serratia, Pantoea; Lactococcus</i>	Más del 10 %	
Planta de procesado de pollo y suelo	<i>Pseudomonas</i>	Entre 5 y 10 %	Møretro et al. (2006)
	<i>Aeromonas/ Shewanella,</i>	Menos del 5 %	
	<i>Pseudomonas</i>	Predominante	
Matadero	Enterobacterias: <i>Serratia</i>	Más del 10 %	Møretro et al. (2013)
	<i>Staphylococcus</i>	Presencia	
	Bacterias del ácido láctico (<i>Aerococcus</i>)	Predominantes	
Planta de procesado	<i>Serratia, Enterobacter, Citrobacter</i>	Más del 10 %	Hultman et al. (2015)
	<i>Pseudomonas, Acinetobacter</i>	Presencia	
Macro planta de procesado	Enterobacterias: <i>Yersinia</i>	Predominante	Stellato et al. (2016)
	<i>Bacillus/Paenibacillus, Staphylococcus</i> y bacterias del ácido láctico	Presencia	
Micro planta de procesado	<i>Pseudomonas, Acinetobacter, Staphylococcus, Bacillus/Paenibacillus</i>	Presencia	Stellato et al. (2016)
	<i>Brochothrix, Psychrobacter, Lactococcus, Streptococcus, Carnobacterium</i>	Más del 10 %	
Micro planta de procesado	<i>Pseudomonas, Acinetobacter, Staphylococcus</i>	Presencia	Stellato et al. (2016)
	<i>Brochothrix, Psychrobacter, Streptococcus, Carnobacterium</i>	Más del 10 %	

*Presencia: cuantificación no mencionada.

Los microorganismos persistentes pueden acabar en los productos finales mediante contaminación cruzada y alterarlos, afectando la calidad de éstos. Por una parte, estos microorganismos pueden tener un efecto positivo inhibiendo la proliferación de patógenos o, al revés, favoreciendo su asentamiento bajo la formación de biofilms mixtos (Giaouris et al., 2015). En presencia de la microbiota natural de estanterías de madera, las poblaciones depositadas de *L. monocytogenes* permanecieron estables o incluso disminuyeron hasta 2

log (UFC/cm²) después de 12 días de incubación a 15°C en todas las condiciones probadas. Por el contrario, las poblaciones de *L. monocytogenes* aumentaron hasta 4 log (UFC/cm²) cuando el biofilm de microbiota residente se había inactivado térmicamente, lo que sugiere que el ecosistema persistente en las estanterías de madera es capaz de controlar determinados patógenos (Mariani et al., 2011). Por otra parte, las bacterias residentes podrían desempeñar un papel en la permanencia y propagación de los genes de resistencia a los antimicrobianos (Verraes et al., 2013). Por estos motivos, es fundamental progresar en la identificación de las bacterias establecidas en los entornos de procesado de alimentos.

A nivel práctico, en cuanto a la toma de muestras para caracterizar esta microbiota, es importante que se realice después del programa de higienización habitual de la industria y utilizar un método que garantice el desprendimiento de los biofilms. Como mínimo, si se busca identificar el microbioma presente, se deben recolectar muestras de superficies que se hayan sometido a protocolos de limpieza y desinfección regulares. Si las superficies están siempre o algunas veces (como los fines de semana) secas antes de que comiencen las producciones, se deben tomar muestras de las superficies o equipos después del secado. Además, lo más común es que el cultivo se efectúe en medios no específicos y a una temperatura de 30°C, perdiendo la opción de identificar los microorganismos psicrófilos. Se debe tener cuidado de neutralizar los posibles residuos de desinfectantes ya que, si se liberan las bacterias del biofilm de forma forzada, pueden morir al estar expuestas a estos compuestos químicos. Los resultados obtenidos se verían entonces desviados de la realidad ya que sólo se recuperarían las bacterias más resistentes y la carga se vería infravalorada. Otro aspecto a tener en consideración sería el tiempo y la temperatura entre la recogida y el análisis de las muestras porque pueden alterar los resultados (Møretro y Langsrud, 2017).

Røder et al. (2015) llevaron a cabo un estudio en el que aislaron 687 cepas de un matadero de Dinamarca (invierno de 2012), concretamente, a partir de siete áreas de muestreo (picadora, tabla de cortar limpia y usada, pared existente detrás de la tabla de cortar, envasadora, muestras de aire de dos salas). Procedieron a la identificación mediante pirosecuenciación y no se incluyeron los microorganismos anaerobios debido a los procedimientos de aislamiento. En la tabla de cortar, después de su uso, predominaba *Pseudomonas* spp. (69,7 %), seguido de *Sphingobacterium* spp. (15,3 %). En cambio, la tabla de cortar limpia estuvo dominada por *Sphingobacterium* spp. (51,9 %), seguida por *Stenotrophomonas* spp. (14,9 %), *Brevundimonas* spp. (13,9 %) y *Chryseobacterium* spp.

(9,2 %). Los últimos tres géneros constituyeron sólo el 2 % o menos en la tabla de cortar usada. Esto indica claramente un cambio en la distribución después de los procedimientos de limpieza. La muestra de la pared colindante a la tabla de cortar estuvo dominada por *Pseudomonas* spp. (56,9 %), que también fue la clase más prevalente en ambas muestras de aire (44,8 % y 52,9 %). *Kocuria* spp. (69 %) dominó la picadora de carne, mientras que *Psychrobacter* spp. (72,7 %) fue predominante en la envasadora. El género Gram positivo *Brochothrix* spp. también se encontró como un componente menor en algunas de las muestras. Una de las especies dominantes en este género, *B. thermosphacta*, puede alterar la carne refrigerada.

Chevallier et al. (2006) caracterizaron la ecología microbiana de una pequeña fábrica de salchichones, que trabaja sin adición de *starters* o cultivos iniciadores que fomentan la fermentación y maduración del producto. Muestrearon doce puntos de las superficies y equipos, cinco materias primas y productos y en diferentes épocas del año: invierno y primavera. Las poblaciones correspondientes a la microbiota tecnológica (bacterias del ácido láctico, estafilococos/*Kocuria* spp. y mohos/levaduras) se encontraron en bajas cantidades en las superficies y aparatos (por debajo de 10^2 UFC/cm²), pero alcanzaron un nivel de aproximadamente 10^6 - 10^7 UFC/g para las bacterias del ácido láctico y estafilococos/*Kocuria* spp. y aproximadamente 10^4 UFC/g para mohos/levaduras en el producto final. En otro estudio, enfocado a pequeñas plantas de producción de embutidos (más tradicionales), hallaron que todas las superficies y equipos estaban colonizadas por cocos coagulasa negativos (*Staphylococcus* spp.), mohos y levaduras y *Pseudomonas* spp. (Talon et al., 2007).

Dzieciol et al. (2016) se focalizaron en el estudio de las comunidades microbianas presentes en los sumideros. Resaltaron que las especies presentes en el agua de drenaje cambian constantemente, mientras que los biofilms de los sumideros son nichos más estables. La microbiota de estas áreas se caracterizó mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA. Valoraron además el estado de contaminación por *L. monocytogenes* aplicando qRT-PCR. Las unidades taxonómicas operativas más abundantes fueron *L. lactis*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas fragi*, *Leuconostoc citreum* y *Acetobacter tropicalis*.

A nivel de la microbiota instaurada en las industrias cárnicas, se puede concluir que existe una gran variedad de familias bacterianas y variabilidad en cuanto a los resultados obtenidos ya que influyen muchos factores como la naturaleza del producto trabajado, condiciones

ambientales, etc., sin embargo, parece ser que predominan géneros como *Pseudomonas* spp., enterobacterias, bacterias del ácido láctico, *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. y *Acinetobacter* spp.

Finalmente, es interesante resaltar que, hasta el momento, el enfoque propuesto para el control microbiológico de las superficies de la industria alimentaria ha sido la reducción máxima de la carga microbiana. Para ello, ha sido necesario el diseño de productos con distintas actividades para emplearlos en las operaciones de limpieza y desinfección. No obstante, lo que no se ha planteado hasta el momento y que podría ser de interés, es utilizar microorganismos que tengan la capacidad de competir con patógenos y que, por tanto, impidan su crecimiento. En este sentido, y correlacionándolo con las alternativas de desinfección mencionadas anteriormente, encontrar microorganismos con capacidad de producir enzimas anti-QS podría ser una opción para tener en consideración como potenciales inhibidores. Un reciente estudio ha propuesto que la teoría higiénica de las superficies, utilizada tradicionalmente por la industria alimentaria, podría reconsiderarse mediante el uso de este tipo de microorganismos, siempre y cuando no muestren ningún tipo de efecto de deterioro para el producto alimenticio (Ripolles-Avila et al., 2019). En el estudio realizado por Torabi Delshad et al. (2018), se utilizaron diferentes microorganismos capaces de producir enzimas anti-QS con el objetivo de reducir la motilidad y posterior biofilms de *Yersinia ruckeri*, patógeno que produce la enfermedad entérica de la boca roja, que afecta a truchas. Como se demostró una alta efectividad *in vitro*, se llevó a cabo una prueba *in vivo* y se observó que los microorganismos inoculados en los peces (entre ellos *Bacillus thuringiensis* y *Citrobacter gillenii*) pudieron prevenir la formación de estas estructuras y, consecuentemente, controlar la enfermedad. En otro estudio, Balabanova et al. (2017) indicaron que el cultivo de bacterias aisladas de productos cárnicos (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *S. enterica*) junto con una bacteria marina, *Cobetia amphilecti*, dio lugar a la inhibición del crecimiento celular de los patógenos y la degradación completa de los biofilms producidos por *P. aeruginosa* y *B. subtilis*. En este caso, el factor antibiofilm descrito fue una enzima nucleolítica extracelular con capacidad para inhibir el QS.

9. *Listeria monocytogenes*

9.1 Descripción

L. monocytogenes es una de las principales preocupaciones de la industria alimentaria (Carpentier y Cerf, 2011; Gandhi y Chikindas, 2007). Este microorganismo es una bacteria Gram positiva y un patógeno intracelular oportunista y facultativo (Da Silva y De Martinis, 2013). Puede provocar una enfermedad llamada listeriosis que afecta a humanos y animales. Aunque la listeriosis es rara, la enfermedad suele ser grave, con altas tasas de hospitalización y mortalidad. En la UE, se reportaron alrededor de 1.470 casos humanos en 2011, con una tasa de mortalidad del 12,7 %. *Listeria* spp. se encuentra en el suelo, las plantas y el agua. El consumo de alimentos o piensos contaminados es la principal vía de transmisión hacia humanos y animales. En las personas infectadas, los síntomas varían, desde síntomas leves parecidos a la gripe, como náuseas, vómitos y diarrea, hasta infecciones más graves, como meningitis y otras complicaciones potencialmente mortales. La tasa de letalidad es especialmente elevada en personas más susceptibles a las infecciones por *L. monocytogenes*, es decir, los ancianos, las mujeres embarazadas, los recién nacidos y las personas inmunodeprimidas (Salama et al., 2018). En animales domésticos, como las ovejas y las cabras, *Listeria ivanovii* puede causar encefalitis, aborto o mastitis. Sin embargo, los animales también pueden ser portadores asintomáticos.

A diferencia de muchas otras bacterias transmitidas por los alimentos, *L. monocytogenes* tolera ambientes salados e incluso puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración (entre + 2°C y 4°C) (EFSA, n.d.). Esta capacidad para mantenerse en condiciones ambientales adversas, existentes tanto en la producción como en el procesado y almacenado de alimentos, hace que sea un patógeno muy persistente y temido por el sector (Carpentier y Cerf, 2011; Gandhi y Chikindas, 2007). *L. monocytogenes* se puede aislar de muchos alimentos como pescado ahumado, carnes, quesos (especialmente quesos blandos), vegetales crudos (EFSA, n.d.) y producto RTE (*ready to eat*). En las industrias alimentarias, se encuentra muchas veces asociado a áreas que han sufrido un incorrecto proceso de limpieza y/o húmedas como pueden ser los sumideros. Bagge-Ravn et al. (2003a) aislaron una cepa de *L. monocytogenes* idéntica, mediante la técnica de la amplificación aleatoria del DNA polimórfico, a la que se había registrado en 1995 en ese mismo ahumadero. Este hallazgo recalca la importancia de los desagües como nicho ecológico de *L. monocytogenes*. Además, muchas cepas de *L. monocytogenes* pueden adherirse a diversas superficies y formar biofilms. Este patógeno de

transmisión alimentaria puede tolerar así condiciones adversas, como por ejemplo una exposición a desinfectantes, formando estas estructuras o desplegando mecanismos de resistencia al estrés. *Listeria* spp. logra así sobrevivir durante largos períodos en las plantas de procesamiento de alimentos (Giaouris et al., 2015; Ortiz et al., 2010; Poimenidou et al., 2016), lo que implica un riesgo permanente de contaminación cruzada de los productos (Giaouris et al., 2015).

9.2 Incidencia de la listeriosis

Las medidas de control mejoradas a partir de la década de 1990 han reducido en gran medida la prevalencia de *L. monocytogenes* en muchas categorías de alimentos, particularmente en carnes y productos cárnicos. Sin embargo, la tasa de listeriosis se ha mantenido constante durante la última década, aunque ha aumentado la severidad de los casos. Los avances recientes en epidemiología y virulencia, modelización de crecimientos, secuenciación del genoma, entre otras, han facilitado la identificación de alimentos contaminados que no se solían asociar con este patógeno (apio, melón, frutas, helado, etc.) (Buchanan et al., 2017).

En enero y febrero de 2016, se registraron cinco casos confirmados y dos casos probables de infección por *L. monocytogenes* serotipo 4b en una región del sur de Suiza. *L. monocytogenes* se detectó en muestras de sangre (cuatro casos) y líquido pleural (un caso). Además, se detectó *L. monocytogenes* 4b en una muestra de heces de una persona asintomática expuesta a un alimento común. La autoridad competente de seguridad alimentaria y un productor de carne *gourmet* local informaron sobre la presencia de *L. monocytogenes* en un paté de carne. El análisis de otras muestras de alimentos y ambientales de las instalaciones del productor mostró que los aislados coincidían con las cepas clínicas y confirmó la presencia de *L. monocytogenes* 4b en la picadora siendo la causa de la contaminación de los alimentos (Althaus et al., 2017).

Sudáfrica padeció el brote de listeriosis más grande jamás documentado. Entre enero de 2017 y el 16 de mayo de 2018, hubo 1.034 casos de listeriosis confirmados a nivel de laboratorio, más de 400 (42 %) casos en recién nacidos y 204 muertes asociadas. La tasa de letalidad en Sudáfrica se estima en 28,6 % y es comparable con otros brotes de listeriosis reportados en todo el mundo. El estado de brote se declaró el 5 de diciembre de 2017 y se estableció un grupo de trabajo nacional, con el apoyo de la OMS a través de la INFOSAN y la Red Mundial de Alerta y Respuesta ante Brotes Epidémicos (GOARN). Se utilizó la secuenciación

genómica para apoyar la investigación y averiguar la fuente del brote. A principios de marzo de 2018, se identificó una instalación de producción de una popular boloñesa local como la fuente del brote. Después de los retiros de productos y la comunicación de riesgos para la salud pública, el número de casos se redujo rápidamente y sólo se identificaron tres casos en los dos meses siguientes. En cambio, dado el largo período de incubación de la listeriosis (hasta 70 días) y cinco meses de vida útil de los productos implicados, es probable que surgieran más casos en los meses siguientes (Salama et al., 2018).

En cuanto a la UE, en 2017, se notificaron 2.480 casos confirmados de listeriosis en humanos. Ha habido una tendencia al alza, estadísticamente significativa, de casos confirmados de listeriosis en la UE durante el período 2008-2017, así como durante los últimos cinco años (período 2013-2017). Dieciséis Estados Miembros informaron de 227 muertes por listeriosis en 2017. La letalidad en la UE fue del 13,8 % entre los 1.633 casos confirmados, una leve disminución en comparación con 2016. El número de informes varió considerablemente de acuerdo con la categoría de alimento RTE. Teniendo en cuenta los alimentos RTE, aquéllos en los que se encontraron más positivos fueron pescados y derivados (6 %) seguido de ensaladas RTE (4,2 %), carne RTE y productos cárnicos (1,8 %), quesos blandos y semiblandos (0,9 %), frutas y verduras (0,6 %) y quesos duros (0,1 %). Estos datos son similares a los recolectados en 2016 aunque en 2017 se tomaron más muestras para todas las categorías de alimentos.

Relativo a la carne y a los productos cárnicos RTE (de cerdo, ternera, pollos de engorde, pavos), veinte Estados Miembros reportaron sus datos de 2017. El 93,4 % de todas las muestras se obtuvieron a partir de carne de cerdo, el 3 % de carne de pollos, el 2,3 % de vacuno y el 1,2 % de pavo (nótese el desequilibrio en las muestras tomadas). La incidencia general de *L. monocytogenes* en productos cárnicos RTE fue del 1,8 % (400 de las 22.544 muestras analizadas fueron positivas) sin diferencias significativas entre las categorías (EFSA y ECDC, 2018).

9.3 Interacciones entre *L. monocytogenes* y otras especies bacterianas en biofilms mixtos

Los microorganismos que presentan una gran capacidad de colonización y formación de biofilms podrían contribuir a la persistencia de *L. monocytogenes* en las instalaciones de la industria alimentaria, constituyendo así un riesgo potencial para la seguridad alimentaria.

Pseudomonas spp. posee justamente tales propiedades y, como se ha mencionado anteriormente, se encuentra comúnmente en las superficies de procesado de alimentos incluso después de la limpieza y la desinfección (Giaouris et al., 2015). La **Tabla 8** recoge múltiples ejemplos de estudios de interacciones entre *L. monocytogenes* y otras bacterias.

Tabla 8. Interacciones entre *L. monocytogenes* (Lm) y otras especies bacterianas. Modificado de Giaouris et al. (2015).

Especies enfrentadas a Lm	Resultados	Referencia
<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ 150	Inhibidor de Lm si es mayoritario dentro del biofilm mixto.	Leriche et al. (1999)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Inhibe la formación de biofilms de Lm.	Leriche y Carpentier (2000)
<i>Flavobacterium</i> spp.	Potencian la formación de biopelículas de Lm.	Bremer et al. (2001)
<i>Pseudomonas fragi</i>	Inhibe la formación de biofilms de Lm.	Norwood y Gilmour (2001)
Biofilm previo de <i>Pseudomonas putida</i>	Mayor adherencia de Lm por la producción de EPS de <i>P. putida</i> (cambio propiedades de las superficies).	Hassan et al. (2004)
<i>Enterococcus durans</i> y <i>Lactococcus lactis</i>	Inhibidores de Lm, parece ser que producen metabolitos anti- <i>Listeria</i> .	Zhao et al. (2004)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Resultados variables, cepa dependientes: no se vio afectada por la presencia de aislados de <i>S. aureus</i> , excepto por la cepa CIP 53.156.	Rieu et al. (2008)
<i>Salmonella enterica</i> y <i>Escherichia coli</i> a la vez	Se identificaron 2 capas bien definidas: la superior con <i>E. coli</i> y la inferior con regiones mixtas de Lm y <i>S. enterica</i> .	Pan et al. (2009)
<i>Lactobacillus sakei</i> , productor de la bacteriocina sakacina	Inhiben las etapas tempranas de la adhesión de Lm a la superficie abiótica.	Winkelströter et al. (2011)
Gram negativas como <i>Serratia</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp. y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Inhiben la formación de biofilms de Lm.	Gudmundsdottir et al. (2005), Daneshvar et al. (2013)
<i>P. putida</i>	La presencia de Lm aumentó la resistencia de <i>P. putida</i> pero no al revés. Después del desinfectante, el biofilm biespecie quedó compuesto al 90 % por <i>P. putida</i> .	Giaouris et al. (2013)
Bacterias del ácido láctico	Suelen controlar el desarrollo de Lm mediante exclusión competitiva y la síntesis de ácidos orgánicos y bacteriocinas.	Guillieret al. (2008), Mineiet al. (2008), Habimana et al. (2009, 2011), Woo y Ahn (2013), Pérez-Ibarreche et al. (2014)
Cocktail de <i>Pseudomas</i> spp. (<i>P. fragi</i> , <i>P. savastanoi</i> , <i>P. putida</i> y <i>P. fluorescens</i>)	Resultados variables, inhiben o favorecen el crecimiento de biofilms de Lm en función de la especie.	Papaioannou et al. (2018)
<i>P. fluorescens</i>	Favorece el crecimiento de biofilms de Lm tanto de las células bacterianas como de la matriz extracelular.	Puga et al. (2018a)

Otros estudios han revelado que la competencia de nutrientes es el principal mecanismo responsable de la inhibición de *L. monocytogenes* en presencia de otras especies en forma de biofilms mixtos (Langsrud et al., 2016; Leriche and Carpentier, 2000).

En los biofilms de *L. monocytogenes*, se han identificado dos sistemas de QS: el sistema de señal AI-2 reportado en bacterias Gram negativas y Gram positivas, casi definido como un sistema de comunicación interespecies universal y el sistema de QS mediado por péptidos *Agr*, característico de bacterias Gram positivas. Aunque *L. monocytogenes* puede producir AI-2, la evidencia experimental indica que esta especie carece de receptores de AI-2. Por lo tanto, esto sugiere que AI-2 es una señal de comunicación de *L. monocytogenes* hacia otras especies (Giaouris et al., 2015).

En conclusión, es esencial progresar en la caracterización de la microbiota residente en las superficies y en sus interacciones con *L. monocytogenes* (Giaouris et al., 2015) ya que puede favorecer o inhibir su crecimiento. La microbiota instaurada en las industrias alimentarias es una potencial herramienta de control intrínseco de las mismas ya que, frente a un problema de contaminación cruzada recurrente por *L. monocytogenes*, se podrían crear estrategias de potenciación de inhibidores y eliminación de bacterias que favorecen el crecimiento y/o supervivencia de este patógeno. Estas estrategias estarían además en acorde con las nuevas tendencias de los consumidores que rechazan cada vez más el empleo de sustancias químicas en el sector alimentario en general. Estos últimos asocian mayores riesgos alimentarios y presencia de productos químicos, plaguicidas u otros y/o residuos de estos último en los alimentos. Éstos son algunos de los datos recogidos en el estudio “*Global Consumer Food Safety and Quality*”, realizado por *TraceOne*, en el que se entrevistaron a más de 3.000 consumidores de nueve países distintos, entre ellos España (Ortuño, 2012). En general, los consumidores asocian también ausencia de sustancias químicas a una mejor salud (Loussaïf y Moigno, 2012). La sociedad teme claramente estar expuesta, sin su conocimiento, a productos químicos y a sus residuos en los alimentos (Niewczas, 2014). En consecuencia, recurrir a la propia naturaleza presente en las industrias alimentarias podría constituir una estrategia de control complementaria más aceptada por la sociedad.

**IV. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN
SUPERFICIES DE UNA PLANTA DE PROCESADO
DE CERDO IBÉRICO MEDIANTE LA
IMPLEMENTACIÓN DE SENSORES SCH**

1. Planteamiento inicial

Este primer estudio se llevó a cabo en dos plantas (A y B) de procesado de cerdo ibérico pertenecientes a una misma empresa. La actividad de la planta A se centra en el loncheado y envasado de productos cárnicos crudos y curados listos para el consumo, procedentes de la planta B. Esta última alberga un matadero con capacidad de matanza de 300 animales al día, anexo a una planta de procesado donde se elaboran, principalmente, productos cárnicos curados: jamones, paletas, lomos, salchichones y chorizos. Dentro de estas cinco familias se encuentran más de treinta productos distintos, en cuanto a formulaciones, tamaños, pH (desde 4,3 hasta 6,3) y/o condiciones de maduración. En general, el proceso de producción se basa en, primeramente, el sacrificio de los animales con la emisión de canales, seguido de la fase de despiece. Después de la refrigeración, los productos del despiece pasan a la etapa de salazón, picado o adobado para hacer embutidos. Después, se finaliza el proceso con el curado o maduración y la posterior expedición (Ortiz et al., 2010).

El objetivo general del estudio fue aislar e identificar bioquímicamente la microbiota presente en trece puntos distintos (tres de la planta A y diez de la planta B) de las superficies de una industria cárnica.

Como objetivos específicos se plantearon:

- i) La identificación de los microorganismos residentes después de los procesos de limpieza y desinfección, mediante sensores SCH.
- ii) Comparar las especies presentes entre los puntos donde *L. monocytogenes* fue aislada y en los que no.
- iii) Investigar *a posteriori* la presencia de posibles inhibidores o potenciadores de *L. monocytogenes* en la propia microbiota de la industria, para reforzar las estrategias de control de este patógeno persistente.

Este estudio supone una fase previa a otro posterior, enfocado a la búsqueda de microorganismos que afecten al desarrollo de *L. monocytogenes* (tanto de bacterias aerobias mesófilas como de bacterias del ácido láctico).

2. Materiales y métodos

2.1 Planteamiento del estudio

Este análisis ecológico se superpuso temporalmente, durante 16 semanas no consecutivas, a otro estudio cuantitativo a largo plazo de estas mismas superficies. Ripolles-Avila et al. (2019) realizaron un seguimiento de la contaminación de ambas plantas durante 21 meses (de mayo de 2016 a enero de 2018) con un total aproximado de 980 muestras, recogidas semanalmente de los trece puntos (**Tabla 9**) donde se instalaron los sensores SCH (Premiumlab, Barcelona, España).

Tabla 9. Descripción de los puntos de las superficies donde se colocaron los sensores SCH, de la planta A y B (codificados de 1 a 13) (Ripolles-Avila, 2018).

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

Los puntos de las superficies a evaluar se establecieron teniendo en consideración dos aspectos diferentes. Por una parte, en base al historial de resultados de muestreo obtenidos por la empresa, donde se encontraron altos niveles de contaminación microbiológica y, por otra, mediante el empleo de BioFinder para confirmar *in situ* la presencia de biofilms en aquellos puntos con una elevada carga microbiana.

Los sensores SCH son discos de acero inoxidable AISI 404 grado 2B (2 cm de diámetro y 1 mm de espesor), que se acoplan a una base, mediante la acción de unos imanes de neodimio, recubiertos por pintura epoxi. Estas bases (placas de acero inoxidable AISI 316 grado 2B, de 3 cm x 7 cm) pueden albergar tres sensores de forma simultánea, lo que permite un análisis semanal de los discos que han permanecido tres semanas en las superficies (**Figura 6**). Los soportes se sueldan en las áreas a evaluar. Esta herramienta permite que los discos estén en las mismas condiciones que el resto de las superficies de aquella zona. Los sensores se ven

sometidos a la misma contaminación y limpieza/desinfección que las superficies que se pretenden muestrear (Montañez-Izquierdo et al., 2012). Estos discos permiten analizar los biofilms naturales que se pueden haber formado en su superficie. En este sentido, Moen et al. (2016) afirmaron que las piezas de acero inoxidable son adecuadas para analizar la microbiota natural del entorno circundante y para diferentes estudios posteriores. Mostraron, concretamente, una variación de tan sólo un 5,1 % entre los sensores y los fregaderos (material real de estudio).



Figura 6. Base con los sensores SCH correspondientes (d) y ejemplos de su colocación en la industria colaboradora. Modificado de Ripolles-Avila (2018), siendo (a) el suelo del lavadero de los carros de fresco; (b) la mesa de loncheado; y (c) el lateral de la envasadora al vacío.

Para la toma de muestra, se recogió semanalmente un disco que había permanecido tres semanas en las instalaciones bajo estudio. La extracción del sensor de su soporte se efectuó con una barra imantada estéril y se depositó de forma aséptica en un frasco estéril. Después, para seguir con la monitorización, se volvía a colocar un nuevo disco estéril en el espacio de la base liberado. Todos los discos analizados estuvieron el mismo tiempo en la instalación antes de analizarse, es decir, tres semanas tal y como se mencionaba anteriormente. Los frascos que llevaban los sensores fueron enviados al laboratorio en una caja de poliestireno expandido para aislar las muestras térmicamente.

En la **Figura 7**, se esquematizan las principales salas y los posibles flujos de materiales y personas entre éstas. Se aprecia también la ubicación de los sensores en relación a estas instalaciones y al proceso de producción.

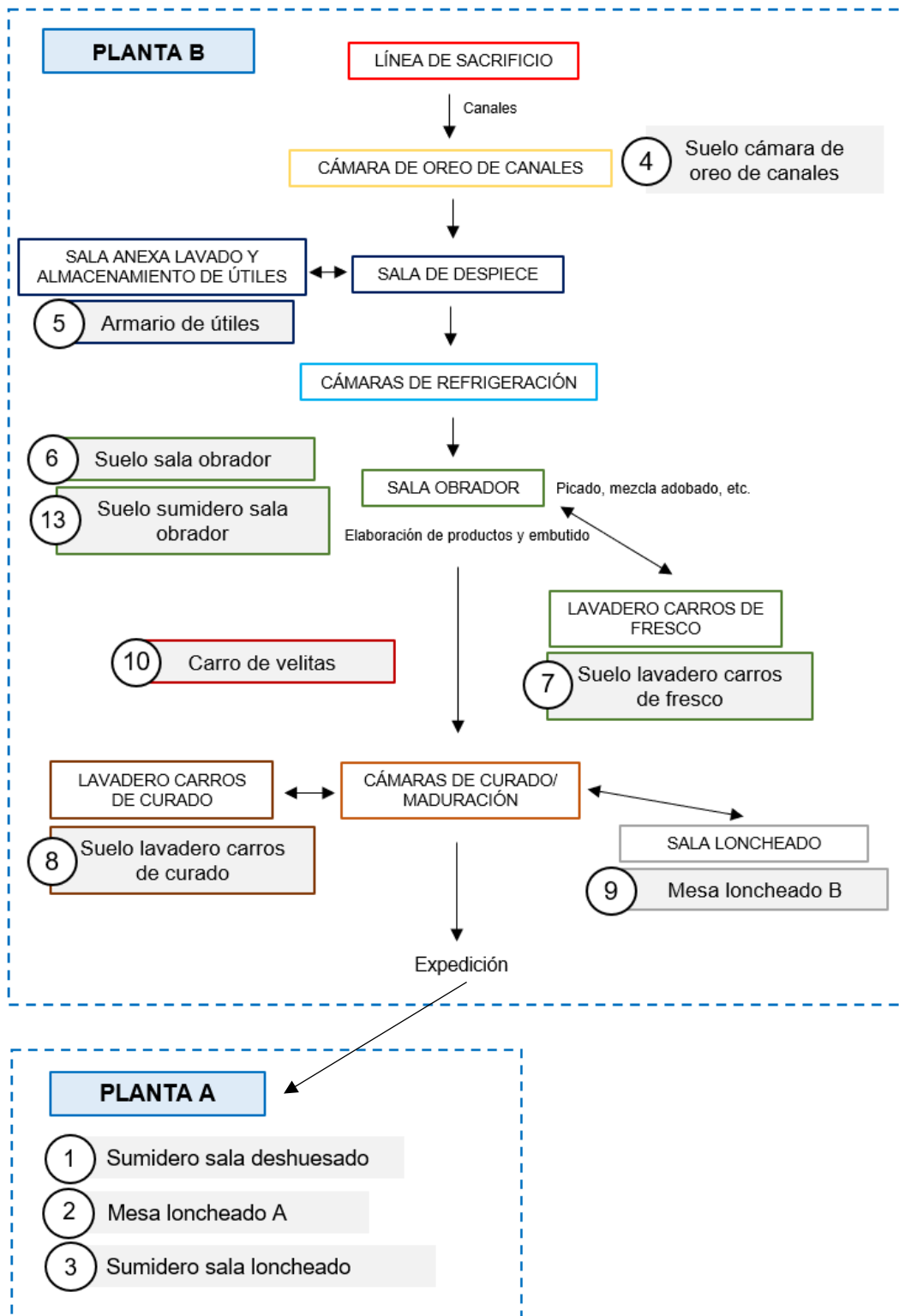


Figura 7. Diagrama de las principales salas y sensores SCH implantados para el estudio de la planta A y B. Modificado de Ortiz et al. (2010). No se representan los sensores 11 y 12 ya que no se pudo establecer un perfil ecológico de estos puntos.

2.2 Análisis microbiológico cuantitativo de las superficies de trabajo

En el laboratorio, se procedió, por una parte, al recuento de aerobios totales, enterobacterias, coliformes/*E. coli*, *Staphylococcus* coagulasa positivo, bacterias del ácido láctico y levaduras. Por otra parte, se investigó la presencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*. Para desprender los microorganismos de los sensores se eligió la técnica de recuperación por agitación con perlas (ISO 13697 – UNE-EN 2015). En este sentido, los SCH se trasladaron a frascos estériles que contenían 3,5 g de perlas de vidrio (2 mm diámetro) y 9 ml de agua de peptona (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Los frascos se sometieron a una agitación mediante vórtex durante 1,30 minutos a una frecuencia de 40 Hz. Esta técnica de agitación con perlas permite una elevada extracción de microorganismos, derivando en un recuento real de la carga microbiana y en una alta reproducibilidad (Montañez-Izquierdo et al., 2012).

Para realizar los recuentos, se efectuaron diluciones decimales de la suspensión resultante en agua de peptona y se transfirió a diferentes medios de cultivo. En el caso del recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales, se recurrió al sistema TEMPO (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Para el resto de los grupos microbianos, se realizaron según las normas ISO 21528 parte 2, ISO 4832, ISO 6888 parte 3, ISO 15214 e ISO 21527, para enterobacterias, coliformes/*E. coli*, *Staphylococcus* coagulasa positivo, BAL y mohos y levaduras, respectivamente. Para la detección de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, se llevó a cabo el método ISO 6579 parte 1 y el método ISO 11290 parte 1, respectivamente. Durante el periodo en el que se hizo a la vez el análisis cuantitativo (Ripolles-Avila et al., 2019) y cualitativo de las muestras (objeto del presente capítulo), las muestras se sembraron también en placas de PCA (*Plate Count Agar*, Oxoid, Madrid, España), y se incubaron durante 48 horas a 30°C para proceder al aislamiento de las colonias. El proceso de análisis de las colonias presentes y su aislamiento, también se realizó a partir de las placas de MRS (*Man, Rogosa and Sharpe agar*, Oxoid, Madrid, España). El interés de las BAL fue debido a su capacidad de producir sustancias anti-*Listeria* (Coelho et al., 2014; Giraffa et al., 1995; Ribeiro et al., 2016; Winkowski et al., 1993).

2.3 Metodología para el aislamiento y la identificación

Para identificar una muestra representativa de los microorganismos residentes en las superficies, se procedió al aislamiento aleatorio del 10 % del total de las colonias, con diferencias morfológicas, presentes en las placas de PCA. Se picaban, en una primera fase,

todas las colonias a aislar con la ayuda de una asa con forma de pincho, previamente flameada y se repicaba en medio TSA (*Tryptic Soy Agar*, Oxoid, Madrid, España). Este proceso se realizó durante 8 semanas. Después, se hicieron 3 resiembras consecutivas en estría por agotamiento en TSA (18-24 horas a 37°C), para purificar el microorganismo aislado. En una segunda fase, se procedía a una caracterización previa con las pruebas de catalasa, oxidasa, KOH y observación al microscopio óptico con tinción de Gram (Sharma y Anand, 2002). Los microorganismos se mantenían en tubos de agar TSA inclinados en condiciones de refrigeración (+/- 4°C) hasta realizar su identificación final. En una tercera fase, se procedió a una completa identificación mediante el sistema de identificación BD BBL Crystal para Gram positivos y kits API 20E y 20NE para Gram negativos enterobacterias y no enterobacterias, respectivamente. Las posibles levaduras encontradas en la etapa anterior se cultivaron en medio específico Sabouraud (de 5 a 7 días a 20-25°C) y se identificaron mediante API 20 C AUX. Para la identificación de las BAL crecidas en medio MRS, se efectuó el mismo procedimiento que para las colonias presentes en medio PCA, pero picando y resembrando en MRS (48 horas a 30°C). Se realizó una prueba API 50 CHL a todas las bacterias catalasa negativas aisladas a partir del MRS con el fin de conocer las especies presentes. Para el empleo de todos los kits, se siguieron las instrucciones de uso marcadas por las empresas fabricantes, inoculando múltiples tiras reactivas que albergaban una batería de pruebas bioquímicas específicas (Ahmed y Sabiel, 2016).

2.4 Análisis estadístico de los datos

Se planteó determinar cuál era la relación entre las áreas estudiadas y su grado de semejanza en cuanto al perfil de aerobios mesófilos. Como han realizado también otros autores (Feligini et al., 2012), se realizó un análisis por clústeres jerárquicos, donde se clasificaron estas ubicaciones de la planta formando grupos/conglomerados, lo más homogéneos posible dentro de sí mismos y heterogéneos entre clústeres. En este caso, el análisis de conglomerados jerárquicos fue el más adecuado ya que no se conocía *a priori* el número de clústeres y, además, el número de áreas a clasificar era reducido (once zonas). El programa estadístico midió, para ello, la proximidad entre dos conglomerados calculando la media de las distancias entre las áreas de ambos grupos. A partir de las distancias euclídeas entre todos los puntos, se generó una matriz de proximidad entre los objetos (Universidad de Granada,

2015). Finalmente, se representaron las distancias entre clústeres de áreas muestreadas a través de un dendograma.

3. Resultados y discusión

3.1 Especies identificadas

Se aislaron 523 microorganismos a partir de los medios de cultivo PCA y MRS. Se descartaron 240 aislados catalasa positivos del medio MRS ya que, en esta parte del estudio, se investigaba sólo la presencia de BAL. A partir de estos aislamientos, se identificaron 200 microorganismos con perfiles diferentes, incluyendo bacterias aerobias, lácticas y levaduras. Los resultados de las identificaciones se muestran, a continuación, en las **Tablas 10, 11 y 12**, en orden de mayor a menor presencia en las superficies.

Tabla 10. Géneros y especies identificadas a partir de cultivos en PCA. También se indica si son bacterias Gram positivas o negativas.

especies identificadas	% vs bacterias aisladas	% vs microorganismos aislados
Levaduras	-	29,0
<i>Bacillus</i> spp.	28,2	20,0
<i>Pseudomonas</i> spp.	21,8	15,5
<i>Mannheimia haemolytica</i>	9,1	6,5
<i>R</i>	7,3	5,2
<i>Staphylococcus</i> spp.	6,4	4,5
<i>Aeromonas</i> spp.	5,5	3,9
<i>Leifsonia aquatica</i>	3,6	2,6
<i>Serratia</i> spp.	3,6	2,6
<i>Enterobacter asburiae</i>	3,6	2,6
<i>Proteus vulgaris</i>	1,8	1,3
<i>Corynebacterium</i> spp.	1,8	1,3
<i>Helcococcus kunzii</i>	0,9	0,7
<i>Aerococcus urinae</i>	0,9	0,7
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,9	0,7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,9	0,7
<i>Ewingella americana</i>	0,9	0,7
<i>Ralstonia pickettii</i>	0,9	0,7
<i>Vibrio</i> spp.	0,9	0,7
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,9	0,7
Total	100,0	100,0
Tinción de Gram	%	
Gram positivas	42,7	-
Gram negativas	57,3	-
Total	100,0	-

Tabla 11. Bacterias del ácido láctico identificadas a partir de cultivos en MRS.

Especies identificadas	Total	%
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i>	23,0	51,1
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	8,0	17,8
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	6,0	13,3
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i>	4,0	8,9
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0	2,2
<i>Pediococcus damniosus</i>	1,0	2,2
No identificadas	2,0	4,4
Total	45,0	100,0

Tabla 12. Levaduras identificadas a partir de cultivos en PCA.

Especies identificadas	Total	%
<i>Candida zeylanoides</i>	27,0	61,4
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	3,0	6,8
<i>Candida krusei</i>	2,0	4,5
<i>Candida ciferri</i>	2,0	4,5
<i>Candida spp.</i>	2,0	4,5
<i>Candida pelliculosa</i>	1,0	2,3
<i>Candida magnoliae</i>	1,0	2,3
<i>Cryptococcus terreus</i>	1,0	2,3
No identificadas	5,0	11,4
Total	44,0	100,0

Como muestra la **Tabla 10**, se puede observar que, globalmente, en cuanto a aerobios mesófilos, existe una mayor proporción de bacterias Gram negativas (57,3 %). Según Møretro et al. (2013), las bacterias Gram negativas, como *Pseudomonas* spp., forman más biofilms que las Gram positivas. La presencia de los géneros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Ralstonia* spp. y las especies *Proteus vulgaris* y *S. maltophilia* han sido descritas también en almacenes frigoríficos de carne cruda (Doulgeraki et al., 2012). En los resultados del presente estudio, los géneros bacterianos mayoritarios fueron *Bacillus* spp. (28,2 % de las bacterias aisladas) y *Pseudomonas* spp. (21,8 %). A nivel de especies identificadas, dentro de *Bacillus* spp., se identificaron *B. subtilis*, *Bacillus megaterium*, *B. licheniformis* y *B.* Las especies del género *Pseudomonas* spp. fueron *P. fluorescens*, *Pseudomonas luteola* y *Pseudomonas stutzeri*, entre otras. Estos resultados coinciden con otros estudios de superficies, en los que *Pseudomonas* spp. se encontró como uno de los géneros predominantes (Bagge-Ravn et al., 2003b; Dzieciol et al., 2016; Maes et al., 2019; Mertz et al., 2014). Stellato et al. (2016), al evaluar también una planta de procesamiento de carne de vacuno y cerdo, identificaron a

Pseudomonas spp. y a varias especies de enterobacterias, como componentes mayoritarios de la microbiota de las superficies. De hecho, la mayoría de las superficies de contacto con los alimentos están altamente contaminadas por *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* y mohos y levaduras, microbiota que puede alterar los productos (Gounadaki et al., 2008). Además, según el estudio de Marouani-Gadri et al. (2009), los géneros dominantes de la industria cárnica bajo análisis fueron *Staphylococcus* spp. y *Bacillus* spp., que eran el 34 % de los aislados del matadero de vacuno y el 14 y 4 %, respectivamente, de la sala de despiece. Incluso en un sector completamente distinto como el de las industrias lácteas, Sharma y Anand (2002) revelaron el predominio del género *Bacillus* spp. en dos plantas. Observaron también la presencia, como en el presente estudio, de *Lactobacillus* spp.

De forma secundaria, se encontró en las dos plantas (A y B) de procesamiento de cerdo ibérico *Mannheimia haemolytica* (9,2 %), *R* (7,3 %), *Staphylococcus* spp. (6,4 %) y *Aeromonas* spp. (5,5 %) (**Tabla 10**), siendo esta última común en lo encontrado por otros autores tales como Hoodt y Zottola (1997) y Mertz et al. (2014). Del género *Aeromonas* spp., aparecieron en estas superficies *Aeromonas hydrophila/caviae* y *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, entre otras. En otro matadero evaluado después también del proceso de limpieza y desinfección, los géneros bacterianos identificados a partir de un medio no selectivo fueron *Aerococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. y *Serratia* spp. (Møretro et al., 2013). En cuanto a *Staphylococcus* spp., se encontraron especies tales como *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus kloosii* o *Staphylococcus capitis*. Detallando el género *Serratia* spp., se identificaron *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* y *Serratia plymuthica*. En otro estudio llevado a cabo por Maes et al. (2019), los géneros más abundantes de la microbiota presente en superficies de contacto con alimentos fueron *Pseudomonas* spp., *Microbacterium* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. Entre ellos, *Stenotrophomonas* spp. se identificó en 2 de las 7 plantas bajo evaluación, y todos los aislados de éste eran alterantes potenciales.

En un estudio ambiental llevado a cabo por Popowska et al. (2010), se determinó la susceptibilidad a la tetraciclina y a la estreptomina de varias especies bacterianas residentes en los suelos. *R* y *S. maltophilia* fueron las más resistentes a ambos antibióticos. Las plantas de tratamiento de aguas residuales no consiguen eliminar totalmente los antimicrobianos

(provenientes aparentemente de fertilizantes de origen animal), y algunos, como la eritromicina y la tetraciclina, no se descomponen en absoluto mediante este proceso. Las tasas de degradación de los antibióticos en el medio ambiente varían considerablemente: la tetraciclina se degrada sólo en un 24 % en 10 a 180 días (según las condiciones ambientales), mientras que la estreptomycin empieza a degradarse a partir de los 30 días. En este mismo estudio, se destaca que, en todos los suelos estudiados, que contenían altas concentraciones de ambas sustancias, se encontraron a especies como *R. A. salmonicida*, *Burkholderia cepacia* y *S. maltophilia*, tres de las cuales fueron identificadas en el presente estudio, tanto en las plantas A y B de procesado de cerdo ibérico.

A pesar de que las levaduras se identificaran a partir del medio de cultivo no específico PCA, se puede observar que su proporción respecto al resto de microorganismos presentes es coherente. Asimismo, según los resultados del macro estudio cuantitativo sobre el estado de contaminación de estas mismas superficies, los mohos y levaduras representaron un 31,93 % (Ripolles-Avila, 2018), en comparación con el presente estudio cualitativo en el que se llegó a identificar un 29,03 % de levaduras. Entre las levaduras encontradas, se detectó de forma mayoritaria *Candida* spp. ya que sólo se aisló cuatro veces *Cryptococcus* spp. (**Tabla 12**), resultados que coinciden también con otros estudios (Bagge-Ravn et al., 2003b; Gounadaki et al., 2008). No obstante, pocas caracterizaciones de la microbiota de superficies mencionan las especies de mohos y levaduras aisladas.

Los equipos y las superficies de industrias alimentarias albergan a todo un ecosistema microbiano, tanto durante la producción, como después de la limpieza y la desinfección. La microbiota es en parte un reflejo de la materia prima utilizada. En este caso, para la producción de embutidos crudo-curados como el salchichón o el chorizo, se emplean cultivos iniciadores (o *starters*). Un cultivo típico para la elaboración de este tipo de embutidos está compuesto por *Lactobacillus sakei*, *S. xylosum* y *Staphylococcus carnosus* (Bañón et al., 2011). En este sentido, en las instalaciones evaluadas en el presente estudio, se encontró efectivamente la presencia de *Lactobacillus* spp. y de *S. xylosum*. Finalmente, en cuanto a las BAL identificadas (**Tabla 11**), Dzieciol et al. (2016) aislaron también a *L. lactis* y *Leuconostoc* spp.

3.2 Perfiles de las superficies muestreadas en cuanto a bacterias aerobias mesófilas

Según el estudio de clasificación por clústeres jerárquicos del perfil ecológico de las áreas muestreadas, aparecen dos clústeres principales. El primero engloba el “(13) suelo sumidero sala obrador”, “(5) armario de útiles”, “(9) mesa loncheado B”, “(3) sumidero sala loncheado” y “(4) suelo cámara de oreo”. Como se aprecia en la **Figura 8**, existe poca distancia dentro de las áreas que conforman este conglomerado, revelando que el perfil ecológico de estas zonas es muy similar. El segundo clúster principal abarca el “(6) suelo sala obrador”, “(7) suelo lavadero carros de fresco” y “(10) carro de velitas”. Los puntos “(8) suelo lavadero carros de curado” y “(2) mesa loncheado A” formarían por ellos mismos dos clústeres diferenciados. Estos dos perfiles fueron notablemente distintos del resto, comportándose, así, como *outliers*. La técnica de clasificación por conglomerados jerárquicos es sensible a la presencia de *outliers* (Universidad de Granada, 2015), es por eso que aparecen como dos otros clústeres.

Superficie	Clúster correspondiente
1: Sumidero sala deshuesado	1
2: Mesa loncheado A	4
3: Sumidero sala loncheado	1
4: Suelo cámara oreo de canales	1
5: Armario de útiles	1
6: Suelo sala obrador	2
7: Suelo lavadero carros de fresco	2
8: Suelo lavadero carros de curado	3
9: Mesa loncheado B	1
10: Carro de velitas	2
13: Suelo sumidero sala obrador	1

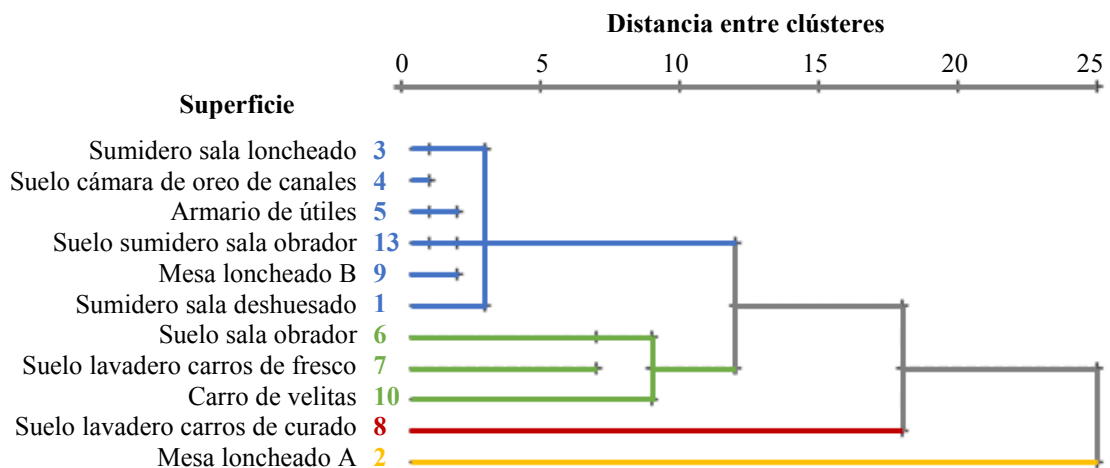


Figura 8. Análisis por clústeres jerárquicos mostrando el grado de similitud del perfil ecológico de las áreas muestreadas. Se aprecian 2 clústeres principales: uno agrupando las zonas 3, 4, 5, 13, 9, 1; y otro con las áreas 6, 7, 10.

En los puntos “(11) lateral envasadora vacío” y “(12) suelo sala tratamiento térmico”, no se pudo establecer un perfil ecológico por la falta de crecimiento en placas PCA. De hecho, estas dos zonas fueron descritas en el estudio cuantitativo (Ripolles-Avila et al., 2019), como menos contaminadas, puesto que no se apreciaron prácticamente recuentos a lo largo del tiempo. Además, se colocó un sensor en el “(11) lateral envasadora vacío” porque se consideraba un punto crítico por parte de la empresa, aunque en esta zona se observó un resultado negativo a la prueba del BioFinder, indicando así ausencia de biofilms.

3.2.1 Clúster 1: predominancia de *Pseudomonas* spp.

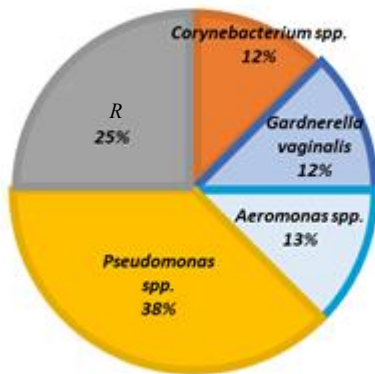
Este clúster, como se puede observar en la **Figura 8**, agruparía las zonas dominadas por *Pseudomonas* spp. Teniendo en consideración los flujos (**Figura 7**), es comprensible que estas zonas tengan un perfil similar ya que, de la cámara de oreo de canales, seguidamente

se pasa a la sala de despiece en la que se manipulan utensilios que se almacenan en el armario de útiles. El “(13) suelo sumidero sala obrador”, al tener la misma proporción de *Bacillus* spp. que de *Pseudomonas* spp., se podría considerar que puede pertenecer a ambos clústeres. La sala obrador recibe productos de la sala de despiece y se realizan en esta sala procesos como el picado, embutido, entre otros. En este conglomerado, 4 de las 6 zonas presentan de 13 a 50 % de *Aeromonas* spp. de forma menos contundente, se identificó también a *Bacillus* spp., *R. Corynebacterium* spp. y *Leifsonia aquatica*. Más anecdóticamente, se aisló *Serratia* spp., *M. haemolytica* y *Gardnerella vaginalis*. Nótese que, aunque físicamente los sensores del “(4) suelo de la cámara de oreo de canales” y el del “(5) armario de útiles” se podrían considerar como cercanos, sus perfiles son totalmente distintos. Esto se podría explicar por la influencia de varios factores tales como la temperatura, humedad y personal circulante, entre otros. Como se ha mencionado anteriormente, las superficies de las instalaciones o útiles suelen ser el reflejo de la materia prima con la que se trabaja (Schön et al., 2016). Se puede imaginar que el suelo de la cámara de oreo de canales entra en contacto únicamente con los fluidos que gotean de las canales (sangre, agua, etc.), ya que las canales van suspendidas y, excepto en caso de accidente, no entran nunca en contacto con el suelo. *R* es una bacteria ubiqüitaria, se encuentra en suelos, tierra, etc., pudiéndose así encontrar en los cerdos ibéricos y ser arrastrado con el agua/sangre de la canal hasta el suelo. Esta bacteria es, de hecho, capaz de formar biofilms sobre materiales plásticos (Stamou et al., 2018).

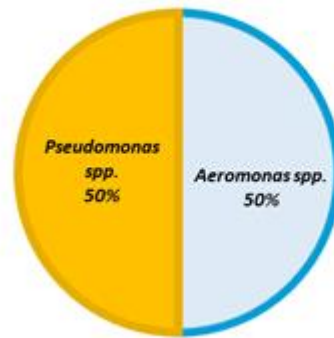
Como en los resultados obtenidos en este estudio (**Tabla 10**), Hoodt y Zottola (1997) identificaron la presencia de *Pseudomonas* spp. y *Aeromonas* spp. en sumideros. En otros estudios, se han aislado *Pseudomonas* spp. (Mertz et al., 2014; Talon et al., 2007), *Enterobacteriaceae* y mohos y levaduras de cuchillos, mesas y máquinas de picado (Gounadaki et al., 2008). *Pseudomonas* spp. se encuentra comúnmente en el suelo o el agua, donde desempeña un papel importante en la degradación del material orgánico. En los seres humanos, son parte de la microbiota normal de la piel y se encuentran en vías respiratorias e intestinos (Adler, 2018). *Aeromonas* spp. es también ubicuo encontrándose habitualmente en fuentes de agua, suelo, artrópodos, moluscos, mamíferos, aves, peces e insectos (Silva O., 2011). *Corynebacterium* spp., presente en el “(1) sumidero de la sala de deshuesado” y “(5) armario de útiles”, tiene asimismo una distribución ubicua y se encuentra en suelos, agua, animales y plantas, especialmente en áreas templadas (Cheney, 2018). Siendo menos común, *Leifsonia aquatica*, aislado de la “(9) mesa de loncheado B” y el “(5) armario de útiles” (**Figura 9**), podría provenir del agua ya que habita el medio ambiente acuático, aislándose

en agua destilada, suministros de agua municipales y agua de pozos. Se caracteriza por tener una baja tasa de crecimiento y capacidad para formar biofilms (Mühlhauser, 2016).

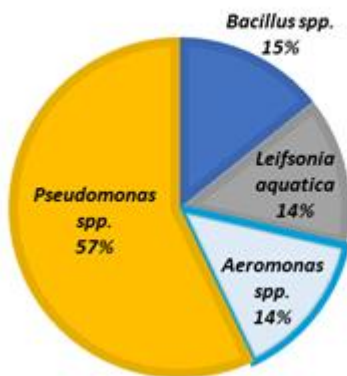
SUMIDERO SALA DESHUESADO (1)



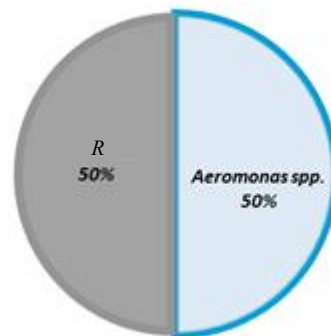
SUMIDERO SALA LONCHEADO (3)



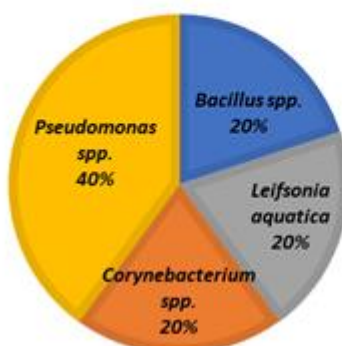
MESA LONCHEADO B (9)



SUELO CÁMARA ORO DE CANALES (4)



ARMARIO DE ÚTILES (5)



SUELO SUMIDERO SALA OBRADOR (13)

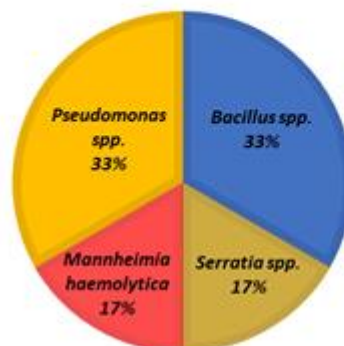


Figura 9. Perfiles individuales de las áreas categorizadas como clúster 1. Nótese la predominancia de *Pseudomonas spp.* en la mayoría de las zonas y notable presencia de *Aeromonas spp.*

En cuanto a *G. vaginalis* del “(1) sumidero sala de deshuesado”, forma parte de la microbiota vaginal de 16-48 % de mujeres en edad fértil (Martínez T. et al., 2004). Aunque el factor de confianza del kit BD BBL Crystal de este único aislado fuera del 96,44 %, la identificación parece dudosa ya que no se ha reportado antes su presencia en este tipo de superficies. Según la empresa comercializadora del kit, se ha comprobado que el sistema identifica con precisión cerca de 500 organismos. Sin embargo, esta herramienta es utilizada habitualmente para diagnósticos clínicos (Becton Dickinson and Company, 2015) y *G. vaginalis* puede participar en la patogenia de la vaginosis bacteriana.

3.2.2 Clúster 2: predominancia de *Bacillus* spp.

En esta segunda agrupación, se puede ver que las áreas “(6) suelo sala obrador”, “(7) suelo lavadero carros de fresco” y “(10) carro de velitas” están mayormente colonizadas por *Bacillus* spp. (**Figura 11**). En la historia de la biología, ha resultado ser cierto que las primeras bacterias identificadas por el hombre, como *Bacillus* spp., son también las más comunes en áreas ocupadas por el ser humano (Kte’pi, 2017). Este género incluye muchas de las bacterias más ubicuas (Kte’pi, 2017). En la **Figura 10**, se recuerda la relación entre estas zonas, próximas físicamente y en las que circula el mismo personal, equipos como los carros de velitas, de producto fresco y materia prima. La carne fresca se trabaja en la sala obrador, se transporta en los carros y se eliminan los posibles restos en el lavadero, siendo los mismos residuos tanto en la sala obrador como en el lavadero de carros de fresco. Las comunidades microbianas son representativas de cada área de procesado y están influenciadas en gran medida por los restos de alimentos, los efluentes líquidos y el agua de lavado (Dzieciol et al., 2016).

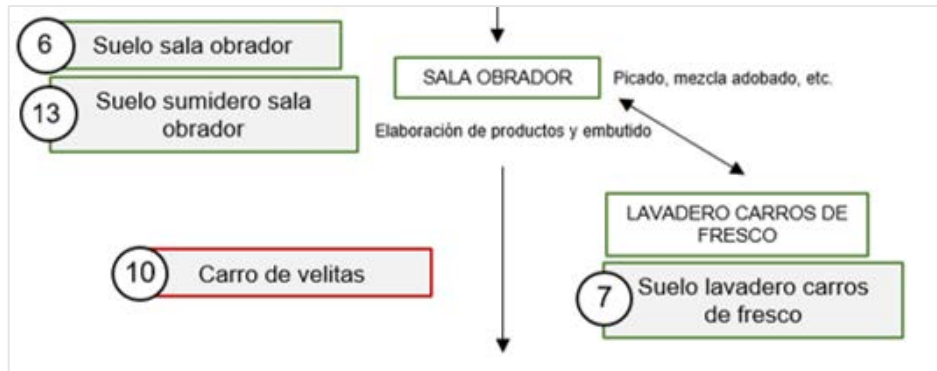


Figura 10. Fragmento de la Figura 7, sobre instalaciones y flujos correspondientes. Se puede observar que los sensores del conglomerado 2, excepto el (13), posible punto de unión entre los 2 clústeres principales, están ubicados en salas y equipos que tienen relación entre sí.

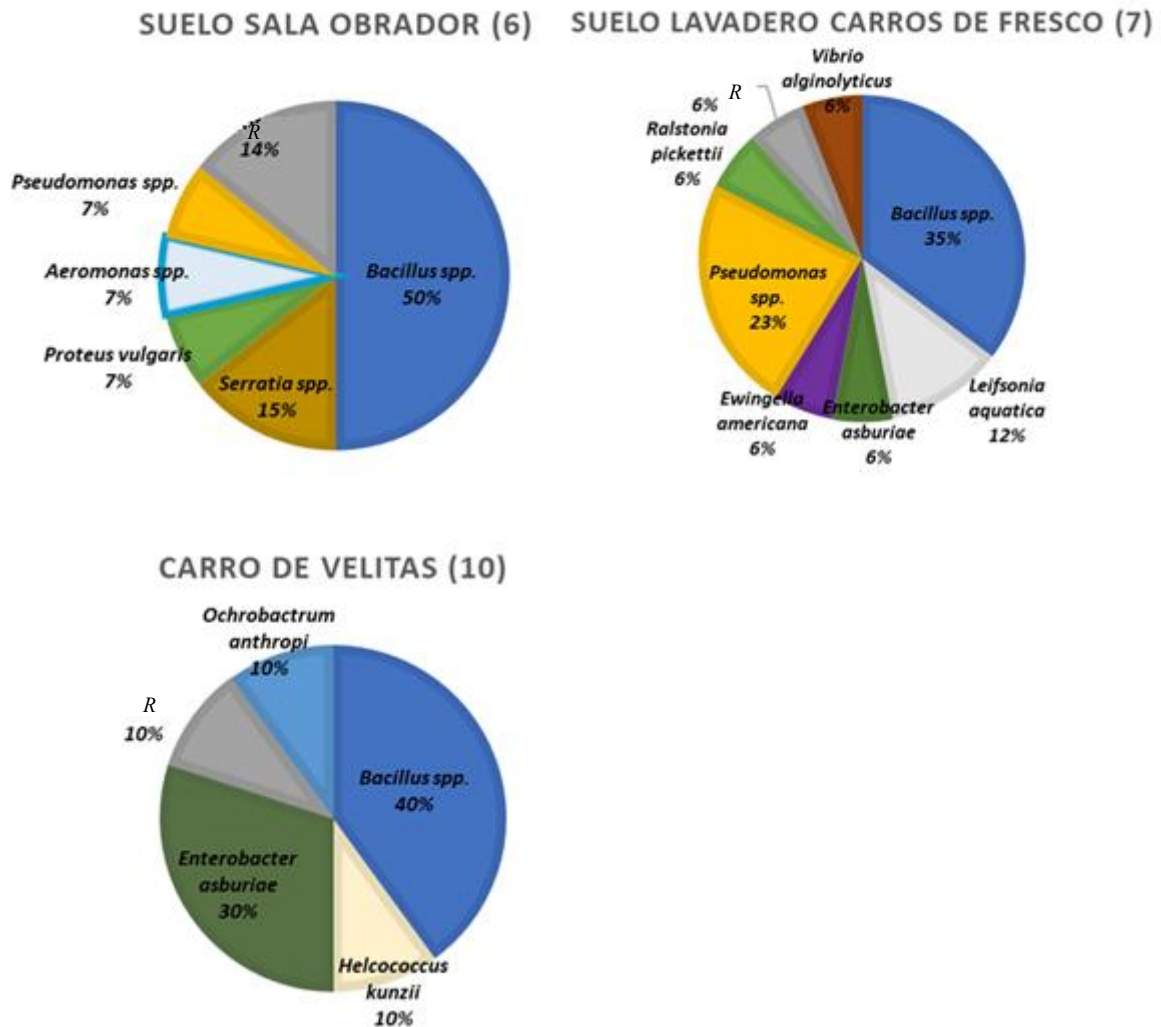


Figura 11. Perfiles individuales de las áreas categorizadas como clúster 2. Nótese la predominancia de *Bacillus* spp. en todas las zonas y la marcada presencia de *R* y *Enterobacter asburiae*.

En cuanto a especies identificadas, *Serratia* spp. es otro punto en común entre el “(6) suelo sala obrador” y el “(13) suelo sumidero sala obrador”. *S. liquefaciens* es una de las enterobacterias dominantes de las áreas de manejo de carne cruda de las plantas envasadoras. Otra especie del género *Serratia* spp. que se identifica a veces es *S. marcescens* (Stiles y Ng, 1981). Estas dos especies se han encontrado en las superficies de la planta B. Identificadas a partir del suelo del lavadero de carros de fresco y del carro de velitas, las bacterias del género *Enterobacter* spp. son bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se les puede hallar en el suelo, el agua y como parte de la microbiota de animales, insectos y tracto gastrointestinal humano (Silva y Pabla Martínez O., 2018).

En menor presencia, *P. vulgaris*, del “(6) suelo sala obrador”, es una enterobacteria que crece principalmente en ambientes anaeróbicos y se encuentra naturalmente en los intestinos de humanos y otros animales. Además, crece en materia fecal y en aguas contaminadas (Kalso, 2019). *Ralstonia pickettii*, del suelo del lavadero de carros de fresco, es una bacteria aerobia Gram negativa del grupo de las *Pseudomonas* spp., que raramente se asocia a infecciones en humanos (Tejera et al., 2016). En esta misma ubicación, se aisló también a *Vibrio alginolyticus*. Esta bacteria marina, de distribución mundial, se encuentra normalmente en numerosos productos de la pesca (Zavala Moreno et al., 2005). Se desconoce su procedencia, pero curiosamente se ha detectado en una sala en la que se trabaja con mucha agua y colindante a una sala de salazón. Asimismo, se observó la presencia de *Ewingella* spp., detectada en alimentos como verduras, moluscos y carne envasada al vacío. Es muy común en los hongos, como el champiñón, el *shiitake* y el hongo ostra (Rozhon et al., 2012).

Ochrobactrum anthropi, presente en el “(10) carro de velitas”, se encuentra habitualmente en el suelo y el agua, pero también puede aislarse de productos biológicos contaminados, como desechos humanos y dispositivos médicos (Aguilera-Arreola et al., 2018). En esta misma área, se constató la presencia de *H. kunzii* que forma parte de la microbiota de la piel humana. Existe un caso en el que se aisló de una cerda con urocistitis purulenta, sugiriendo así su presencia en esta especie (Vergne et al., 2015).

3.2.3 Clústeres 3 y 4: otros perfiles

Los clústeres 3 y 4 corresponden a las zonas “(8) suelo lavadero carros de curado” y “(2) mesa loncheado A”, respectivamente (**Figura 12**). El análisis por clústeres jerárquicos determinó que estos dos perfiles eran distantes de los otros dos clústeres principales (1 y 2). Se podría explicar por la presencia de especies no aisladas en las otras áreas como *Staphylococcus* spp., *S. maltophilia*, *Aerococcus urinae* y la fuerte presencia de *M. haemolytica* en el “(8) suelo lavadero carros de curado”. Como posibles explicaciones de estos perfiles atípicos, para el suelo del lavadero de carros de curado, la materia prima que transportan estos carros es diferente. No desplazan productos frescos, sino géneros que han pasado por un proceso de curación o maduración en el que la microbiota se ve modificada (Gounadaki et al., 2008). Además, esta sala se encuentra en la parte superior de la planta B a diferencia de la mayoría de los otros sensores (excepto la “(9) mesa loncheado B”). La “(2) mesa de loncheado A” está ubicada en la planta A. Es sorprendente que el perfil microbiológico no se asemeje más al sumidero presente en la misma sala, sino que tan sólo compartan a géneros tales como *Pseudomonas* spp. y *Aerococcus* spp. En esta mesa de loncheado, aparece también *S. maltophilia*, una bacteria ambiental que se encuentra en plantas, animales, alimentos y fuentes de agua (Brooke, 2012). Esta bacteria muestra una resistencia inherente a muchos antibióticos. Su capacidad para degradar e inactivar estos compuestos puede promover infecciones por microorganismos más virulentos. En el ámbito hospitalario, se considera de difícil eliminación, porque es capaz de formar biofilms. Por esta razón, esta especie se sitúa dentro de los diez principales microorganismos que causan infecciones nosocomiales (Popowska et al., 2010). No obstante, no se considera un patógeno alimentario, por lo que no tiene implicaciones en el ámbito de la seguridad alimentaria.

En el “(8) suelo del lavadero de carros de curado” se aisló a *A. urinae*, un coco Gram positivo que coloniza el tracto urinario humano. Se podría tratar de un error de identificación ya que el nivel higiénico de la planta es relativamente correcto y no concuerda con este hallazgo. De hecho, en otro estudio, se menciona un posible error de identificación de *Aerococcus* spp. en base a los sistemas API dado que la tipificación bioquímica de este género es difícil (Senneby et al., 2012).

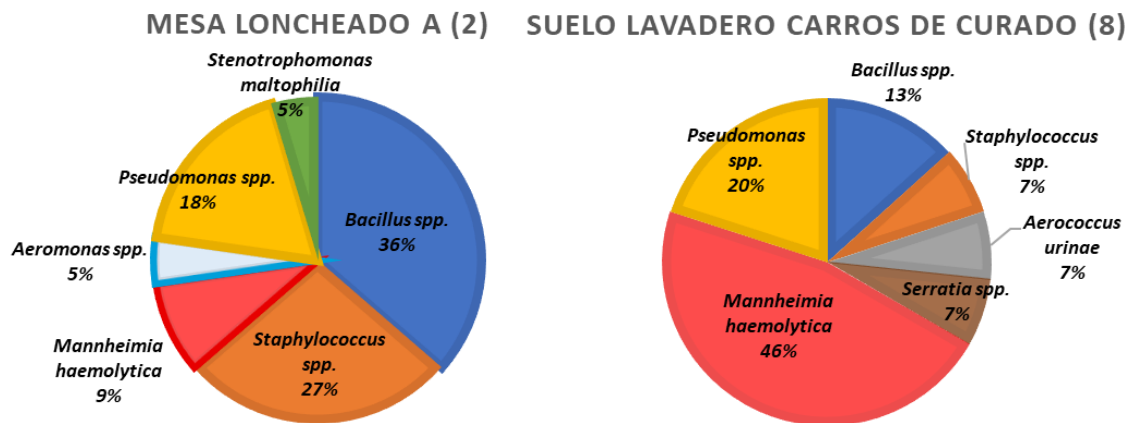


Figura 12. Perfiles individuales de las áreas categorizadas, cada una de ellas, como clúster 3, punto (8), y 4, punto (2).

En un estudio de lacones, *Staphylococcus* spp. se aisló en un 74 % (n=69) de las muestras tomadas del interior de los brazuelos (Vilar et al., 2000). Este género aparece en la mayoría de los estudios de caracterización de la microbiota en productos cárnicos crudos y salchichas fermentadas. Además, el aislamiento de los estafilococos, como *S. simulans*, *S. capitis* y *S. xylosus*, también identificados en el presente estudio, generalmente continúa a lo largo de todo el proceso de fabricación. *S. xylosus* ha sido catalogada como la especie más abundante en otros productos cárnicos crudo-curados, elaboradas a partir de piezas enteras, como el jamón y la *bresaola*. Parece ser que esta especie es muy resistente a condiciones ambientales desfavorables (Vilar et al., 2000).

3.2.4 Identificación inhabitual de *Mannheimia haemolytica*

La identificación de *M. haemolytica*, en los sensores ubicados en la “(2) mesa loncheado A”, “(8) suelo lavadero carros de curado” y “(13) suelo sumidero sala obrador”, fue inesperada. Esta bacteria interviene ocasionalmente en el complejo respiratorio porcino, aunque es

mucho más frecuente en bovinos donde también causa enfermedad respiratoria. Ahmed y Sabiel (2016) identificaron también a *M. haemolytica* en carne picada de vacuno.

Una hipótesis es que, al poder encontrarse en el tracto respiratorio de los animales, este patógeno oportunista pudiera contaminar las canales debido a una manipulación incorrecta, en la etapa de la retirada del aparato respiratorio, por ejemplo. Los humanos no parecen infectarse con este patógeno así que, en principio, se descartaría la implicación de operarios como portadores y posibles fuentes de contaminación de los productos y/o las superficies.

Otra hipótesis podría ser un fallo de la identificación por parte del test API 20E. De hecho, Ahmed y Sabiel (2016) también emplearon este kit comercial para llevar a cabo las identificaciones de sus aislados. En el presente estudio, según los resultados proporcionados por el kit API 20E, en 6 de los 10 aislados de este microorganismo, el porcentaje de probabilidad (ID %) fue igual o superior a 84,6 %, alcanzando hasta el 98,5 %. En este sentido, la empresa comercializadora califica incluso a los tests API como herramientas clínicas (de diagnóstico), no como productos destinados a ser usados en microbiología alimentaria. Aun así, en 1992, cuando ya hacía 20 años que se utilizaban los kits API, una reevaluación del método llevada a cabo por Hara et al. (1992) concluyó que el método era fiable, comparado con pruebas bioquímicas tradicionales. Además, a las 48 horas, el 95,2 % de las muestras fue identificado correctamente mediante el uso de pruebas bioquímicas adicionales como recomendado por el fabricante. En aquel estudio, el kit API 20E no había identificado correctamente 2,7 % de las cepas (Hara et al., 1992). En el presente análisis, no se pudieron identificar en total a 3,5 % de las cepas.

Como último aspecto a considerar, *M. haemolytica* ha sido sometida a una extensa reclasificación pasando anteriormente por las denominaciones: *Bacterium bipolare multocidum*, *Bacillus bovisseptica* y *Pasteurella haemolytica*. Se puede considerar que el género *Mannheimia* spp. comprende cinco especies: i) *M. haemolytica*; ii) *M. granulomatis*, incluye también todas las cepas clasificadas genéticamente como *P. haemolytica-like* (parecidas a *P. haemolytica*), aisladas de conejos, liebres y bovinos; iii) *M. glucosida*; iv) *M. ruminalis*, que incluye cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii*; y v) *M. varigena*, que comprende un grupo de cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupo 6 y Bisgaard taxón 15 y 36, han sido aisladas de bovinos y porcinos, y asociadas con septicemia, neumonía y otros estados patológicos (Jaramillo-Arango et al., 2009).

3.2.5 Perfil de las áreas en cuanto a BAL y levaduras identificadas

Considerando las BAL identificadas, como se puede observar en la **Tabla 11**, la especie predominante es *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Las bacterias del género *Leuconostoc* spp., que causan comúnmente el deterioro de los alimentos envasados en atmósfera modificada y almacenados en frío, se detectaron en gran abundancia en un estudio llevado a cabo en salchichas (Hultman et al., 2015). En otra caracterización de salchichas tipo Viena, las principales *Leuconostoc* spp. aisladas fueron *L. mesenteroides*, *L. fallax* y *L. lactis*. Algunas cepas de *Leuconostoc* spp. detectadas en las superficies de los equipos y de las salchichas mostraron tener el mismo genotipo. La persistencia de *Leuconostoc* spp. en el entorno de procesamiento de salchichas y en el producto final sugiere la existencia de reservorios microbianos, posiblemente en las superficies de los equipos (Padilla-Frausto, 2015).

Como se puede apreciar en la **Figura 13**, las BAL se aislaron de áreas que entran más fácilmente en contacto directo con los productos o materia prima. Estas BAL podrían provenir, por ejemplo, del *starter* que se utiliza para la elaboración de embutidos como salchichones y chorizos.

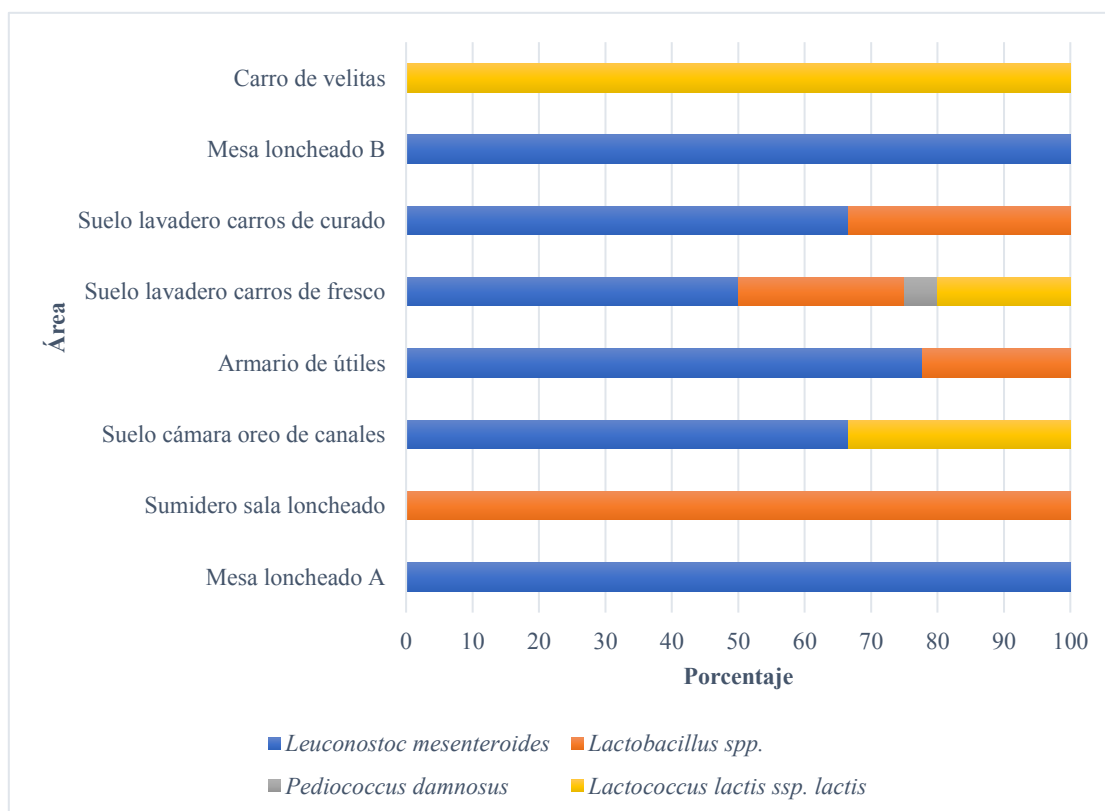


Figura 13. Perfil de las zonas en las que se identificaron especies de BAL.

Como se aprecia en la **Figura 13**, la distribución fue claramente diferente dependiendo de las áreas analizadas. Así, *L. lactis* ssp. *lactis* sólo se detectó en el “(10) carrito de velitas”, como BAL dominante, mientras que su presencia se reveló en el suelo del lavadero de carros de fresco y en el suelo de la cámara de oreo de canales. En estos dos puntos, sólo con una presencia menor. El “(10) carro de velitas” correspondía al clúster 2, junto con el “(7) suelo lavadero carros de fresco”. Ambos puntos con una elevada contaminación por *Bacillus* spp. El “(4) suelo de la cámara de oreo de canales” correspondió al clúster 1, pero curiosamente, se trata de un punto donde no hay dominancia de *Pseudomonas* spp. (ver **Figura 8**). Este resultado podría suponer que la presencia de *L. lactis* ssp. *lactis* puede estar asociada a una baja contaminación de *Pseudomonas* spp., lo que requerirá de evaluaciones posteriores.

Curiosamente, *Lactobacillus* spp. se detectó como BAL mayoritaria en el “(3) sumidero de la sala loncheado” (clúster 1), para ser detectado en menor proporción en el “(8) suelo lavadero carros de curado” (clúster 3), “(7) suelo lavadero carros de fresco” (clúster 2) y el “(5) armario de útiles” (clúster 1). En todos ellos, se observa una proporción elevada de *Pseudomonas* spp.

En cuanto a *L. mesenteroides*, se detectó como BAL dominante tanto en la “(2) mesa de loncheado A” (clúster 4) como en la “(9) mesa loncheado B” (clúster 1). Además, se detectó como mayoritario en el “(8) suelo lavadero carros de curado” (clúster 3), “(7) suelo lavadero de carros de fresco” (clúster 2), “(5) armario de útiles” (clúster 1) y el “(4) suelo cámara de oreo” (clúster 1). Por tanto, este microorganismo es el BAL más ampliamente distribuido en la planta estudiada. Además, *L. mesenteroides* podría suponer problemas de alteración en producto acabado, dependiendo de los azúcares libres presentes (Andreevskaya et al., 2018).

Estos resultados permiten abrir nuevas hipótesis de trabajo interesantes. Si dependiendo de la composición de la microbiota láctica, se pueden estimar las características de las superficies y el tipo de microbiota dominante, supondría un avance interesante a valorar, si se desea generar un sistema ecológico preventivo para el crecimiento de determinados patógenos.

Las levaduras, en cambio, se encontraron por todas las instalaciones. *Candida* spp. fue mayoritaria en casi todas las áreas (**Figura 14**), siendo una especie ampliamente distribuida. *Cryptococcus* spp. fue dominante en el “(10) carro de velitas” y fue aislado, además, del “(7) suelo lavadero carros de fresco” y del “(5) armario de útiles”. Chevallier et al. (2006)

caracterizaron la microbiota de una pequeña fábrica de salchichones. Las poblaciones correspondientes a la microbiota tecnológica (BAL, estafilococos/*Kocuria* spp. y levaduras/mohos) se encontraron en superficies, aparatos y producto final. En otro estudio, enfocado a pequeñas plantas de producción de embutidos tradicionales, hallaron que todas las instalaciones y equipos estaban colonizadas por mohos y levaduras (Talon et al., 2007).

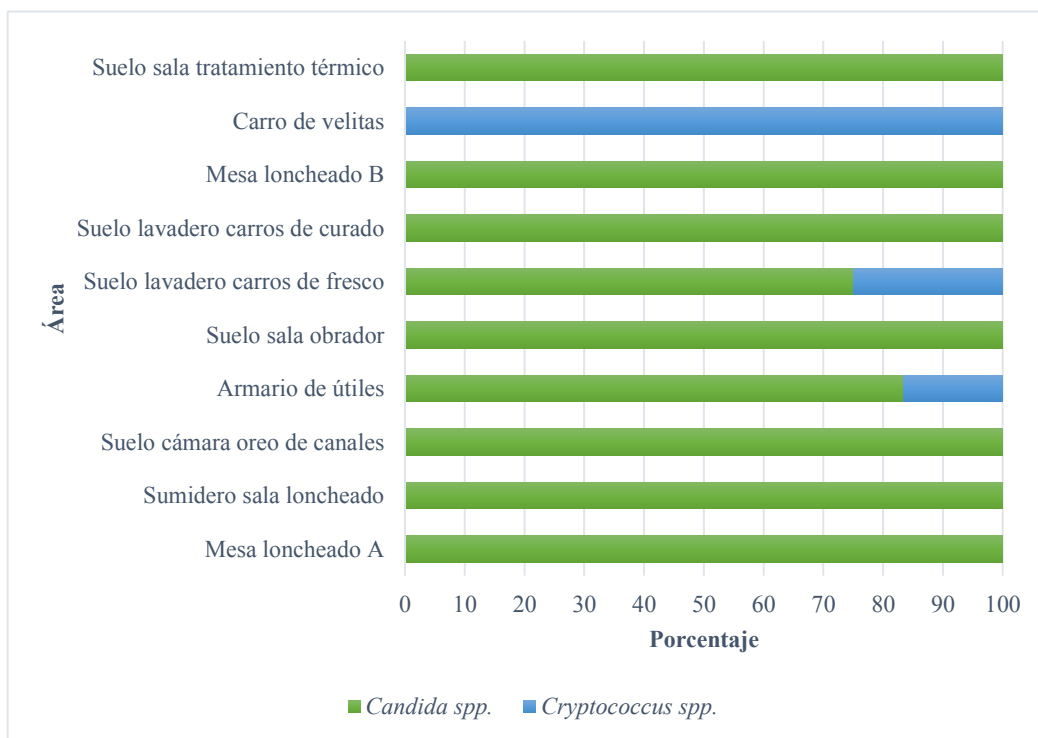


Figura 14. Perfil de las zonas en las que se identificaron especies de levaduras.

3.6 Influencia de la microbiota sobre la presencia de *L. monocytogenes*

En el transcurso del estudio llevado a cabo por Ripolles-Avila et al. (2019), *L. monocytogenes* fue aislada, en cinco ocasiones, de las siguientes áreas: “(5) armario de útiles”, “(8) suelo lavadero carros de curado” y “(10) carro de velitas” (Tabla 13).

Tabla 13. Serotipo y ubicación de los 5 aislados de *L. monocytogenes* obtenidos durante el macro estudio. Contenido extraído de Ripolles-Avila et al. (2019).

Código de identificación	Serotipo	Área monitorizada de la que se aisló
Lm 1 y Lm 2	4b	Armario de útiles Suelo lavadero carros de curado
Lm 3 y Lm 4	1/2a	Suelo lavadero carros de curado
Lm 5	1/2b	Carro de velitas

Analizando el perfil ecológico de las zonas en las que se encontró *L. monocytogenes*, se puede ver que el “(5) armario de útiles” presentó un 40 % de *Pseudomonas* spp., siendo el género mayoritario de la comunidad presente. El efecto de *Pseudomonas* spp. sobre la presencia de *L. monocytogenes* es variable ya que algunos autores han mostrado tanto un efecto positivo (Mertz et al., 2014) como negativo o nulo (Møretrø y Langsrud, 2017). En este sentido, se decidió evaluar el crecimiento de las cepas Lm 2, Lm 3 y Lm 4 sobre biofilms maduros preestablecidos de *P. fluorescens* y *P. luteola*, por separado (ver Capítulo VI, sección 3.3). Todas las cepas utilizadas provenían entonces de la misma planta, aproximándose así a las condiciones reales en las que se encuentran estas bacterias. Los resultados indicaron que *P. luteola* no afectó a *L. monocytogenes* y *P. fluorescens* pareció favorecer incluso el crecimiento de este patógeno.

El “(8) suelo lavadero carros de curado” mostró un perfil atípico con la fuerte presencia de *M. haemolytica*. Se puede notar, no obstante, que el siguiente género con mayores aislados fue *Pseudomonas* spp., que como se acaba de mencionar puede potenciar la presencia de *L. monocytogenes*. También podría influir en este sentido el 7 % de *Serratia* spp. ya que las enterobacterias parecen favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* (Gounadaki et al., 2008; Jessen y Lammert, 2003). Macroscópicamente, especies como *Pseudomonas* spp., parecen producir una sustancia viscosa al colonizar una superficie. Hoodt y Zottola (1997) sugirieron que estos microorganismos producen un material extracelular denso que podría permitir el atrapamiento de otros microorganismos. Estos colonizadores primarios de las plantas de procesamiento de carne podrían albergar patógenos como *L. monocytogenes*.

En cuanto al “(10) carro de velitas”, la presencia de, una vez más, enterobacterias como *Enterobacter asburiae* (30 %) podría beneficiar a *L. monocytogenes*. Sorprendentemente, en esta ubicación, se aislaron también seis veces *L. lactis*, este tipo de BAL pueden producir sustancias anti-*Listeria* (Giaouris et al., 2015; Mariani et al., 2011). No obstante, se enfrentaron también Lm 1, Lm 2, Lm 3 y Lm 4 a todas las especies de BAL aisladas de las

plantas A y B en agar TSA y ninguna afectó a *L. monocytogenes* ya que no se observaron diferencias del crecimiento de esta última con los respectivos controles (ver Capítulo V, sección 3.2). En este sentido, Gounadaki et al. (2008) tampoco observaron un efecto negativo de BAL sobre *L. monocytogenes*.

Se observa también que no se han encontrado en una misma localización serotipos distintos de *L. monocytogenes*. Se podría explicar por el hecho de que cepas de una misma especie también pueden competir entre ellas. Por ejemplo, el serotipo 1/2a parece ser más eficiente en la formación de biofilms que el serotipo 4b (Giaouris et al., 2015; Møretro et al., 2013).

4. Conclusión parcial

La microbiota de las plantas de procesado de cerdo ibérico bajo estudio se vio dominada por *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. Aunque las áreas se pudieron agrupar en dos clústeres principales, el perfil de las zonas fue variado, al igual que la diversidad ecológica, pudiéndose relacionar con la presencia o ausencia de *L. monocytogenes*. Esta última parece estar asociada con uno o más grupos bacterianos específicos como *Pseudomonas* spp. y enterobacterias que pertenecen a la microbiota residente de las instalaciones; sin embargo, un nivel elevado de contaminación no siempre sugiere la presencia de estos patógenos. Conocer las especies que persisten en las plantas de producción y sus interacciones con *L. monocytogenes* puede ayudar a perfilar los programas de limpieza. La presencia de *L. lactis* spp. *lactis* podría estar asociada a una baja contaminación por *Pseudomonas* spp., y *Lactobacillus* spp., al revés, podría estar coligado a una elevada proporción de *Pseudomonas* spp., lo que requerirá de evaluaciones posteriores. Se puede decir, además, que *L. mesenteroides* y *C. zeylanoides* fueron dos microorganismos ampliamente distribuidos en la planta estudiada. Estos resultados permiten abrir nuevas hipótesis de trabajo interesantes. La composición de la microbiota láctica podría servir de indicador de otras especies dominantes; supondría un avance interesante a valorar, si se desea generar un sistema ecológico preventivo para el crecimiento de determinados patógenos. El control de la microbiota que perdura después de los programas de limpieza y desinfección es, por lo tanto, un elemento clave para garantizar la inocuidad y la calidad de los productos finales.

**V. PRUEBAS PRELIMINARES PARA EL CRIBADO
DE POSIBLES INHIBIDORES O POTENCIADORES
DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* PRESENTES EN
LA MICROBIOTA DE UNA PLANTA DE
PROCESADO DE CERDO IBÉRICO**

1. Planteamiento inicial

La microbiota puede favorecer la persistencia de patógenos en una industria cárnica (Møretro y Langsrud, 2017). Conocer las interacciones entre microorganismos que sean alterantes, patógenos o simplemente residentes en las superficies de las industrias cárnicas, puede convertirse en una estrategia de control complementaria a los procesos de limpieza y desinfección. No obstante, es muy difícil entender cómo se comportan estos microorganismos en su ambiente real. Existen muy pocos estudios al respecto y que, además, consigan imitar la realidad. Se debe tener en cuenta también que las comunidades no se comportan igual cuando los microorganismos están en forma libre, en medio líquido y/o sólido o generando biofilms. Para avanzar en ello se deben plantear estrategias, consiguiendo no sólo un cribado rápido de los microorganismos de mayor interés, sino también optimizar los recursos económicos y de tiempo.

El objetivo de este segundo estudio fue detectar inhibidores o potenciadores del crecimiento de *L. monocytogenes* entre las especies residentes, identificadas previamente (ver Capítulo IV), en la industria colaboradora (plantas A y B) de procesado de cerdo ibérico.

Para ello, se plantearon una serie de pruebas de cribado para, partiendo de las 43 especies diferentes aisladas en las instalaciones, trabajar con los microorganismos de mayor potencial.

Se presentan a continuación tres estudios:

- i) Valoración de las interacciones directas cruzando cuatro cepas de *L. monocytogenes* con cada una de las especies identificadas (aerobios mesófilos, BAL y levaduras) en agar TSA.
- ii) Evaluación del crecimiento de tres cepas de *L. monocytogenes* frente al cultivo libre de células de dos microorganismos con potencial anti-*Listeria*.
- iii) Análisis del crecimiento de tres cepas de *L. monocytogenes* en co-cultivo en medio líquido con los mismos dos microorganismos.

2. Materiales y métodos

2.1 Determinación del tipo de interacción entre las diferentes especies aisladas y *L. monocytogenes* en medio de cultivo sólido

En el presente estudio, se planteó evaluar la interacción directa entre cada una de las 43 especies identificadas, como parte de la microbiota residencial de la industria, con cada una de las cepas de *L. monocytogenes* identificadas hasta el momento en la planta de procesado (cuatro cepas: Lm 1, Lm 2, Lm 3 y Lm 4). Estas interacciones se valoraron realizando 172 cruces en placas con TSA, enfrentando así físicamente las dos especies.

La metodología empleada consistió en la realización de cultivos en forma de cruz. Para ello, se seleccionaron 2-3 colonias de una cepa de *L. monocytogenes*, con un asa de siembra estéril y se hizo una primera línea sobre el agar. Posteriormente, se efectuó el mismo procedimiento con la especie a evaluar, pero transversalmente a la primera siembra. Los controles consistían en una única siembra por especie y por placa. Las placas de cultivo se incubaron 24 horas a 37°C y a 30°C, al emplear las BAL. Además, las cruces se efectuaron a partir de cultivos frescos cultivados durante 18-24 horas a 37°C para cada cepa.

2.2 Cultivos de *L. monocytogenes* con un extracto libre de células procedente de dos microorganismos con potencial anti-*Listeria*

A partir del primer cribado mediante la técnica de cruzamiento, previamente descrita, se realizaron estudios complementarios con dos microorganismos potencialmente anti-*Listeria* (*B* y *R*). El objetivo específico de esta prueba fue determinar si los dos microorganismos producían alguna sustancia que pudiese afectar al crecimiento de *L. monocytogenes*. Se evaluó el efecto de un filtrado de cultivo libre de células de *B* sobre dos cepas de *L. monocytogenes* (Lm 2 y Lm 3), y *R* en TSB sobre otras dos cepas del patógeno (Lm 3 y Lm 4), ya que habían mostrado tener una interacción más interesante en las pruebas realizadas en agar sólido. Se enfrentaron las cepas Lm 2 y Lm 3 a extractos de cultivo de las dos cepas a ensayar. Para ello, se probaron diferentes concentraciones de ambos extractos de cultivo acelular: 10, 20, 30 y 40 %. La prueba se llevó a cabo manteniendo siempre una misma proporción, es decir, 50 % de la cepa correspondiente de *L. monocytogenes* (150 µl) y 50 % del extracto (150 µl). Se decidió trabajar con un volumen de 300 µl para evitar desbordamientos en las placas microtiter, durante el cultivo en agitación continua. Para partir de las mismas condiciones de ensayo, de acuerdo con García et al. (2018), todas las especies

se cultivaron en tubos de TSB a 37°C durante 18-24 horas para, de este modo, obtener los cultivos en estado estacionario. De éste, se extrajeron 200 µl y se inocularon en un tubo de 9 ml de TSB hasta alcanzar una turbidez 0,1 McFarland, para las cepas correspondientes de *L. monocytogenes*. Para los extractos, se filtraron los respectivos cultivos con un filtro de membrana estéril de 0,22 µm (Millex-GP 0,22 µm, Merck, Barcelona, España). Se midió el pH para comprobar que no se hubiera producido ningún cambio importante, ya que hubiera sido un factor condicionante al crecimiento del patógeno. Se procedió a la posterior dilución de los extractos con medio TSB estéril para obtener las diferentes concentraciones mencionadas anteriormente. Las diferentes combinaciones de cultivo se realizaron en múltiples pocillos (10 réplicas para cada combinación) en microplacas Honeycomb de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia), específicas para el espectrofotómetro Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia) (**Figura 15**). Una vez inoculados los pocillos, se incubaron los respectivos cultivos a 37°C, en agitación continua, programando lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, cada 30 minutos, durante 48 horas. Los controles de esterilidad se realizaron mezclando 50 % de la cepa de *L. monocytogenes* (150 µl) con el 50 % restante de medio TSB estéril (150 µl). Asimismo, para controlar que los extractos eran estériles, se cultivaron 50 % de extracto (150 µl) con 50 % TSB estéril (150 µl).



Figura 15. Principales etapas del experimento. Modificado del Póster presentado en el XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición “Alimentación 5S” en 2018.

2.3 Co-cultivos en medio líquido entre *L. monocytogenes* y dos microorganismos de interés

Para empezar, se realizó una curva patrón entre el recuento de *B* y *R* con el sistema TEMPO (UFC/ml) y la turbidez asociada a la escala McFarland, de acuerdo con los datos proporcionados por el densitómetro DENSIMAT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Con este objetivo, se inocularon múltiples tubos de TSB con cada microorganismo por separado. Seguidamente, se determinó el recuento en UFC/ml de cada tubo, realizando las diluciones seriadas necesarias, a las que se determinó la turbidez correspondiente. Al utilizar el sistema TEMPO, se rehidrataron viales, que contienen el medio de cultivo deshidratado, con 3 ml de agua destilada estéril y se añadió 1 ml de la dilución decimal correspondiente. El vial de TEMPO inoculado se homogenizó mediante vórtex, y se transfirió, mediante una unidad de llenado, a una tarjeta con 48 pocillos de tres volúmenes diferentes. Durante la incubación, el

crecimiento de/los microorganismo/s provoca una modificación en una señal fluorescente del medio, que es detectada por el equipo de lectura. Dependiendo del número y tamaño de los pocillos positivos, el sistema estima la carga de microorganismos presentes en la muestra en UFC/ml.

En este experimento, se plantearon 12 combinaciones de co-cultivos (**Tabla 14**): Lm 2, Lm 3 con *B* y Lm 3, Lm 4 con *R* en las siguientes proporciones 20-80 %, 80-20 % y 50-50 %. Para ello, se prepararon en cada tanda 48 tubos Eppendorf de 1,5 ml de volumen (incluyendo los controles). Se realizó el recuento total de los microorganismos presentes con el sistema TEMPO a 0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas de cultivo a 30°C. En este caso, se partió de concentraciones iniciales de, aproximadamente, 10 UFC/ml de cada microorganismo para obtener una curva de crecimiento completa, evitando una saturación demasiado temprana del cultivo. Para los controles, esta vez, se empleó diluyente compuesto por una solución salina triptona [TSS; 1 g de triptona (BD, Madrid, España) y 8,5 g de NaCl por cada litro, ajustando el pH a $7,0 \pm 0,2$], para no aportar una cantidad doble de nutrientes a cada microorganismo. También se incluyó un control del propio diluyente para descartar contaminaciones. Los co-cultivos se llevaron a cabo a partir de cultivos frescos de cada microorganismo incubados durante 18-24 horas a 37°C en tubos TSB. Se extrajeron 200 μ l de éstos para obtener tubos de TSB a 0,1 McF homogeneizados con vórtex. Se realizaron diluciones hasta obtener la carga deseada. Después, se realizaron todas las combinaciones ajustándose a un volumen de 1,5 ml en cada tubo Eppendorf (20 % = 0,3 ml; 80 % = 1,2 ml; 50 % = 0,75 ml). Se congelaron, además, las muestras de cada análisis para realizar *a posteriori* PCR y determinar el recuento específico de *L. monocytogenes*, a través de una curva patrón entre valores Ct y UFC/ml (Ripolles-Avila, 2018). La PCR se efectuó siguiendo las instrucciones del fabricante (iQ-Check *Listeria monocytogenes* II PCR Detection Kit, BIO-RAD).

Tabla 14. Composición de las 12 combinaciones probadas.

Combinación	Cepa lm	% Lm	% B	% R	Codificación
1	2	20	80	0	20%L2-80%B
2	3	20	80	0	20%L3-80%B
3	4	20	0	80	20%L4-80%R
4	3	20	0	80	20%L3-80%R
5	2	80	20	0	80%L2-20%B
6	3	80	20	0	80%L3-20%B
7	4	80	0	20	80%L4-20%R
8	3	80	0	20	80%L3-20%R
9	2	50	50	0	50%L2-50%B
10	3	50	50	0	50%L3-50%B
11	4	50	0	50	50%L4-50%R
12	3	50	0	50	50%L3-50%R
Control* Lm 2	2	80/20/50	0	0	80/20/50%CL2
Control Lm 3	3	80/20/50	0	0	80/20/50%CL3
Control Lm 4	4	80/20/50	0	0	80/20/50%CL3
Control B	-	0	80/20/50	0	80/20/50%CB
Control R	-	0	0	80/20/50	80/20/50%CR

* Los diferentes volúmenes de los controles se completaron con diluyente.

2.4 Análisis estadístico

Los recuentos bacterianos obtenidos en la última prueba (co-cultivos) se sometieron a una transformación logarítmica decimal, para reducir la variabilidad de los análisis microbiológicos (Aguilar et al., 2011; Ripolles-Avila, 2018). Los resultados fueron evaluados por análisis de variancia (ANOVA de dos vías), sin correcciones añadidas (*uncorrected Fisher's LSD*).

3. Resultados y discusión

3.1 Patrones de interacción entre microorganismos

Se pueden observar diferentes patrones de crecimiento, ya que una o ambas especies pueden verse favorecidas o inhibidas al hallarse en contacto con la otra especie. En la **Figura 16**, se muestran las diferentes configuraciones de crecimiento que se pudieron observar en las placas de cultivo. El punto de cruce de las dos siembras es el foco de interacción entre las especies en el medio de cultivo.

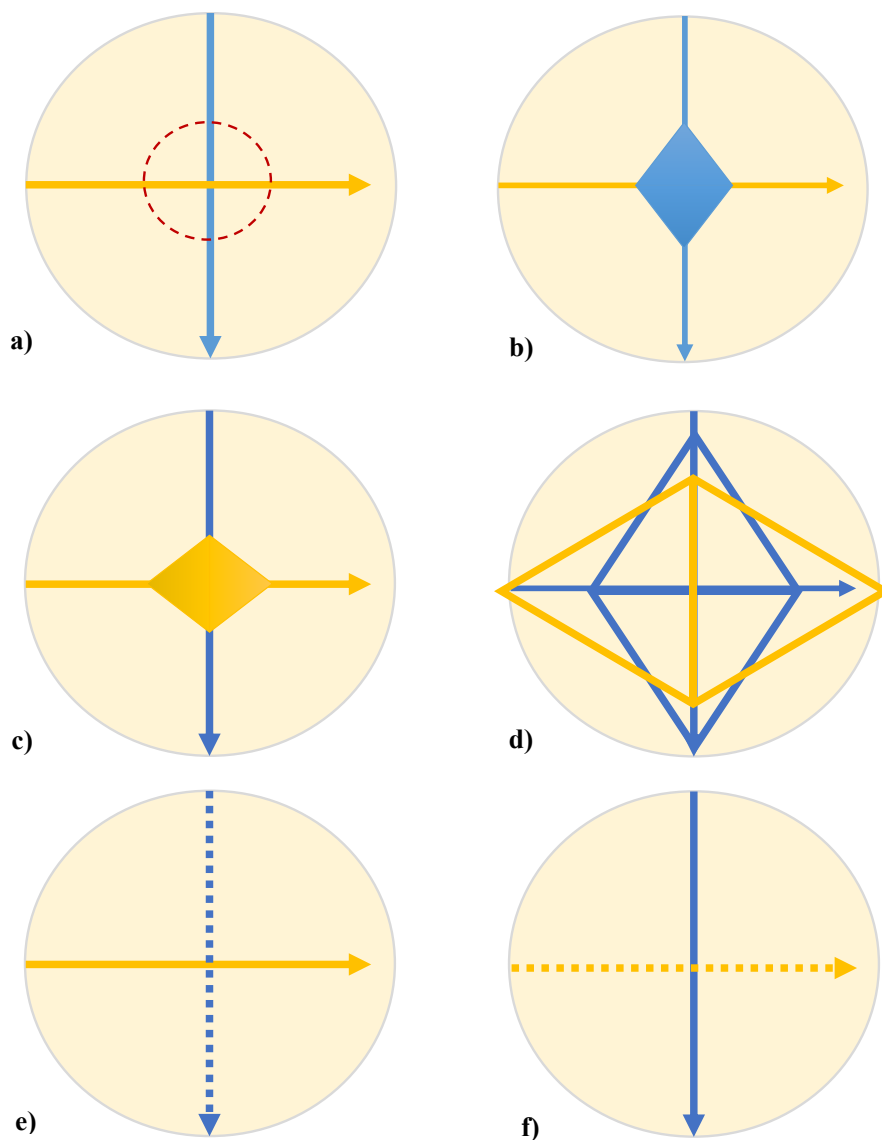


Figura 16. a) Zona de interés en la que se produce la interacción entre ambas especies. En este caso, se consideraría una interacción neutra sin potenciación o inhibición del crecimiento de ninguna de las 2 especies confrontadas; b y c) mayor crecimiento de una de las 2 especies; d) mayor crecimiento de ambas especies; e) y f) una especie crece de igual forma que su control y la otra no crece o de forma menos intensa que su control respectivo.

3.2 Interacciones observadas entre especies

Para representar los resultados de todas las cruces efectuadas, se decidió clasificar los resultados en: i) mayor crecimiento de *L. monocytogenes* (puntuación 0/1); ii) mayor crecimiento de la especie perteneciente a la microbiota de la planta de procesado (1/0); mayor crecimiento de ambas especies (1/1); menor crecimiento de *L. monocytogenes* (0/-1); menor crecimiento de la otra especie (-1/0), menor crecimiento de ambas especies (-1/-1); y iii) crecimiento equivalente al control para ambas especies (0/0). Se atribuyó, entonces, una calificación de -1 a 1 (siendo el crecimiento de menos a más extenso), de 0,5 en 0,5 unidades (para distinguir intensidades de expansión) a cada resultado de interacción. Otra forma similar de clasificar las interacciones entre microorganismos fue descrita por Smid y Lacroix (2013), quienes determinaron cinco tipos de interacciones: i) competencia (-/-); ii) mutualismo (+/+); iii) comensalismo (+/0); iv) amensalismo (-/0); v) parasitismo (+/-). En una relación de competencia, las dos especies se ven afectadas negativamente, en cambio, en el mutualismo, ambas se benefician. En el comensalismo, una especie se ve favorecida sin afectar a la otra presente. En cambio, en el amensalismo, una especie no se ve alterada pero sí afecta a la otra (Aguilar et al., 2011; Smid y Lacroix, 2013). Un ejemplo de amensalismo sería la producción de bacteriocinas por las bacterias del ácido láctico, que pueden afectar a patógenos como *L. monocytogenes* (Guerrieri et al., 2009). El comensalismo puede evolucionar también al parasitismo en el que un microorganismo se beneficia y el otro se ve afectado negativamente (Smid y Lacroix, 2013).

Una dificultad se añadió a la lectura de las placas ya que, cuando la expansión de una de las especies se hacía excesiva, ocultaba el crecimiento o posible inhibición de la otra, dejando dudas sobre la verdadera interacción entre ambas (**Figura 16**). Los resultados representaron entonces una aproximación del posible comportamiento de las cepas y fueron utilizados, únicamente, como primer cribado de microorganismos con potencial interés para próximas etapas del proceso de investigación.

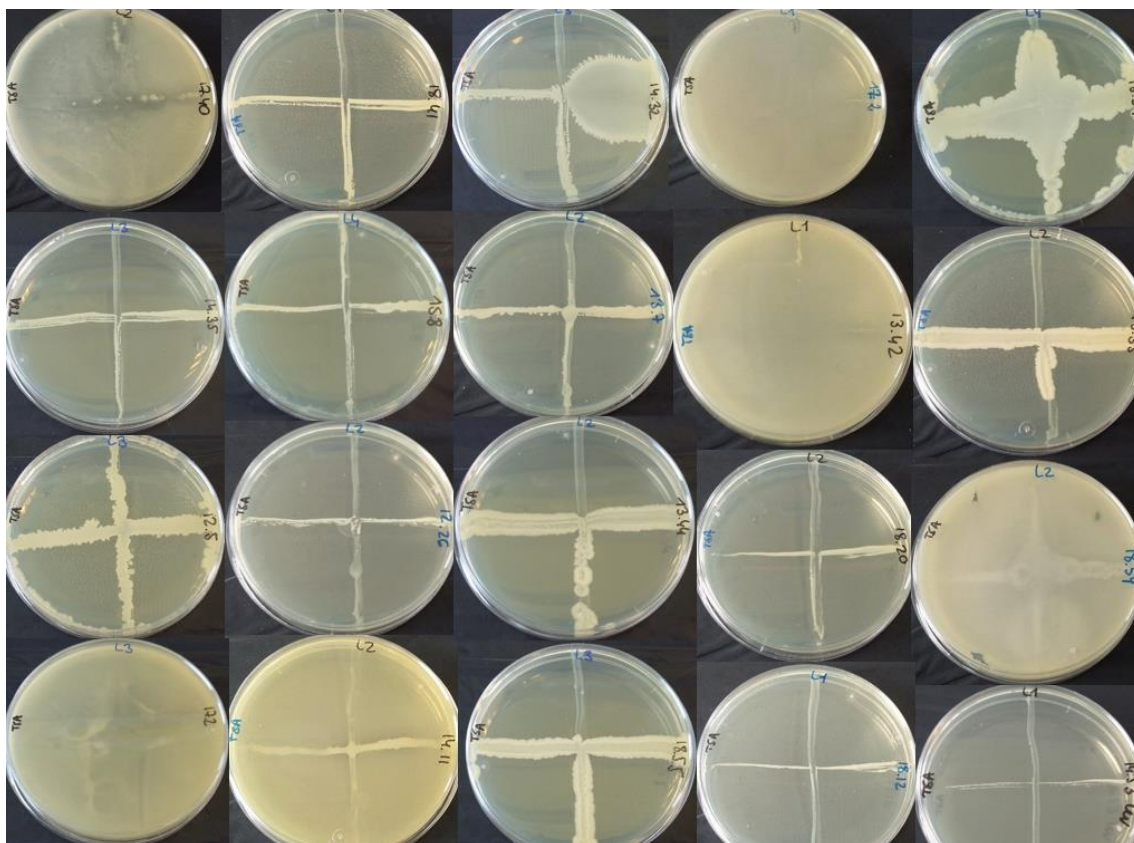


Figura 17. Fotografías de algunas de las cruces obtenidas en agar TSA.

De las 172 cruces (Tabla 15), 6,39 % (n=11) parecieron mostrar un mayor crecimiento de ambas especies respecto a su control; en un 29,65 % (n=51), dominó la especie procedente de la microbiota residente sobre *L. monocytogenes*; en un 4,65 % (n=8), *L. monocytogenes* creció igual que su control y la otra especie obtuvo un menor crecimiento. En la mayoría de los cruzamientos (59,30 %; n=102), no se observó ni sinergia ni antagonismo, cada especie creció de igual forma a su control respectivo.

Tabla 15. Matriz de resultados de las interacciones entre 4 cepas de *Listeria monocytogenes* y 43 especies diferentes (m.o pertenecientes a la microbiota aislada de una industria cárnica).

Especie	Cruzamiento			
	m.o / Lm 1	m.o / Lm 2	m.o / Lm 3	m.o / Lm 4
<i>Bacillus subtilis</i>	1/1*	1/1	1/1	1/1
<i>Proteus vulgaris</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Pseudomonas luteola</i>	1/0**	1/1	1/1	1/1
<i>Bacillus megaterium</i>	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>B</i>	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>Mannheimia haemolytica</i>	0,5/0	0,5/0	0,5/0	0,5/0

<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	0,5/0	0,5/0	1/0	1/0
<i>Enterobacter asburiae</i>	1/0	1/0	1/0	1/0
R	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>Vibrio spp.</i>	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1/0	0,5/0	1/0	1/0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,5/0	1/0	0,5/0	0/0***
<i>Serratia spp.</i>	0,5/0	0,5/0	0/0	0,5/0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,5/0	0,5/0	0/0	1/0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,5/0	0/0	0/0	0/0
<i>Pseudomonas spp.</i>	0,5/0	0/0	0/0	0/0
<i>Helcococcus kunzii</i>	0,5/0	1/0	0/0	0/0
<i>Aeromonas spp.</i>	0/0	0/0	1/0	1/0
<i>Staphylococcus simulans</i>	0/0	0/0	1/0	1/0
<i>Staphylococcus kloosii</i>	0/0	0/0	0/0	1/0
<i>Staphylococcus xylosus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Aerococcus urinae</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Ewingella americana</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Ralstonia pickettii</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Staphylococcus capitis</i>	-1/0****	-1/0	-1/0	-1/0
<i>Leifsonia aquatica</i>	-1/0	-1/0	-1/0	-1/0
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Pediococcus damniosus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Candida spp.</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Candida krusei</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Candida pelliculosa</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Candida magnoliae</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Cryptococcus terreus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Candida zeylanoides</i>	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Candida cifferri</i>	0/0	0/0	0/0	0/0

*1/1: mayor crecimiento de ambas especies; **0,5 a 1/0: mayor crecimiento del m.o; ***0/0: crecimiento equivalente al control para ambas especies; ****-1/0: menor crecimiento del m.o y crecimiento igual al control por parte de *L. monocytogenes*.

Con los resultados obtenidos, se confirma que *L. monocytogenes* es una especie con poca habilidad para competir con otras especies (Dauphin, et al., 2001), ya que en un 28,5 % de las interacciones, se ve dominada por el microorganismo al que se enfrenta. No obstante, *B. subtilis*, *P. vulgaris* y *P. luteola* parecen tener una relación sinérgica con *L. monocytogenes*. Por ello, el control del patógeno no se debería centrar sólo en eliminar a *Listeria monocytogenes*, sino a los grupos que pueden favorecer su implantación o la formación de biofilms en los que pueda sobrevivir.

Al mismo tiempo, se observaron varias interacciones de parasitismo entre una especie aislada de la planta y las cepas ensayadas del patógeno. Entre todas ellas, hay que destacar la obtenida entre *L. monocytogenes* y *B*, y *L. monocytogenes* y *R* (**Figura 18**).

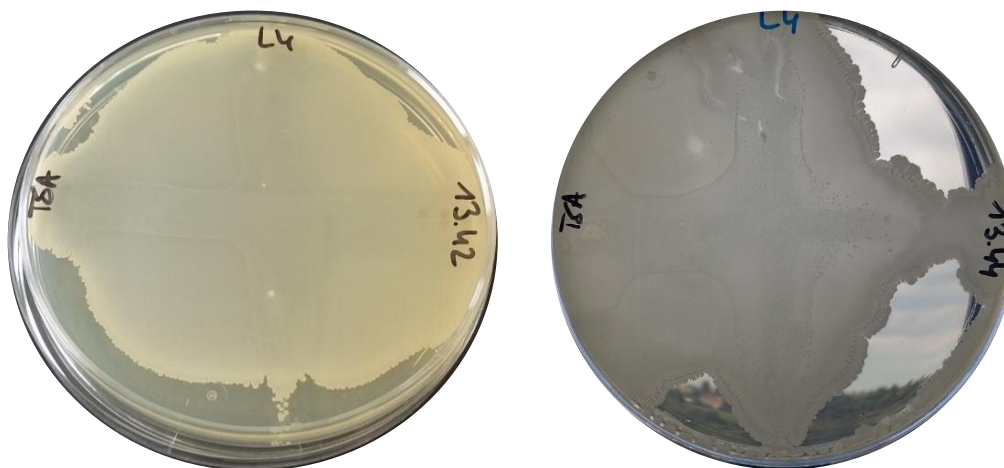


Figura 18. Resultado de las interacciones entre Lm 4 y B y Lm 4 y R.

Wang *et al.*, (2016) evaluaron el efecto de un proceso de inactivación térmica comparando el comportamiento de *L. monocytogenes* en caldo de cultivo y en superficie de agar sólido. Este patógeno mostró, de hecho, tener más resistencia en siembra por superficie en agar. En otro de sus trabajos, también recurrieron al agar BHI (*Brain Heart Infusion*) como uno de los modelos de estudio (Wang *et al.*, 2017). Aguilar *et al.* (2010) realizaron una prueba de difusión en agar para evaluar la presencia de bacteriocinas. Observaron, de hecho, interacción antes de que se pudieran detectar las bacteriocinas. Según Ghoul y Mitri (2016), en su estudio sobre interacciones microbianas empleando placas de agar como metodología de análisis, observaron un halo de inhibición del crecimiento de microorganismos sensibles,

alrededor de una colonia de *E. coli* productora de una colicina. En este mismo estudio, se observó que las colonias de *Streptomyces coelicolor* mostraban un fenotipo distinto, en función de la especie de actinomiceto con la que estaban en contacto directo en agar (Ghoul y Mitri, 2016). Otros autores como Aspri et al. (2017) efectuaron asimismo un cribado de 79 cepas bacterianas previamente aisladas de leche de burra, para analizar su capacidad antibacteriana frente a alterantes y patógenos. Encontraron tres cepas de *Enterococcus faecium* con actividad antibiótica mediada por enterocinas. El cribado fue realizado mediante difusión en agar. Se describió que sólo el 19 % (n=15) de las cepas mostraron un efecto inhibidor. Los resultados de este estudio están en concordancia con los obtenidos en el presente, donde se observa que una baja proporción de las especies que conforman la microbiota residencial, podría comprometer el crecimiento de determinados patógenos como *L. monocytogenes*. Por ello, estimular el desarrollo de estos microorganismos, en las superficies industriales, frente a otro tipo de microbiota, que no ejerce ningún rol preventivo en el control de patógenos, podría ser una nueva vía de investigación. De hecho, a día de hoy, se buscan otras estrategias de control con ácidos orgánicos y compuestos naturales y/o microorganismos (Aguilar et al., 2011).

En el presente trabajo se escogieron finalmente dos especies, *B* y *R*, para continuar con la evaluación del control competitivo, ya que se observó un intenso efecto contra las cuatro cepas de *L. monocytogenes* y, *a priori*, no son microorganismos patógenos.

Rhizobium spp. ha causado alguna infección oportunista, pero son casos extraordinarios como puede ocurrir con casi cualquier microorganismo en personas con inmunodeficiencia (Rothe y Rothenpieler, 2007). Esta especie es ubicua y no se considera, en absoluto, como un patógeno alimentario primario. Tal y como se ha discutido en el capítulo anterior, este microorganismo formó parte de las especies mayoritarias de las superficies de la planta bajo estudio.

B es estrictamente aeróbico, fenotípicamente heterogéneo y puede producir gramicidina, entre otras sustancias antibacterianas (Yang y Yousef, 2018). El hábitat de *Brevibacillus* spp. se superpone con el de *Bacillus* spp., llegándose a encontrar en ambientes muy distintos, incluyendo tierra, agua y aparato digestivo de diversos insectos y animales (Panda et al., 2014). Este microorganismo ha sido objeto de estudio para evaluar su producción de antimicrobianos y su potencial como agente de biocontrol. Se ha probado su efecto frente a numerosos insectos, desde lepidópteros hasta coleópteros; y nematodos, por su capacidad de

producción de proteasas extracelulares. *Brevibacillus* spp. puede presentar también un efecto anti-micobacterias. Produce además una amplia variedad de metabolitos antifúngicos. Por ello, esta bacteria podría controlar algunas enfermedades de plantas (Panda et al., 2014).

3.3 Curva patrón entre unidades McFarland y UFC/ml de *B* y *R*

Se presentan, a continuación, los resultados de la curva patrón realizada para *R* y *B*, relacionando el recuento bacteriano con la turbidez (**Figura 19**). A un mismo rango de turbidez, *B* exhibe un mayor recuento que *R*.

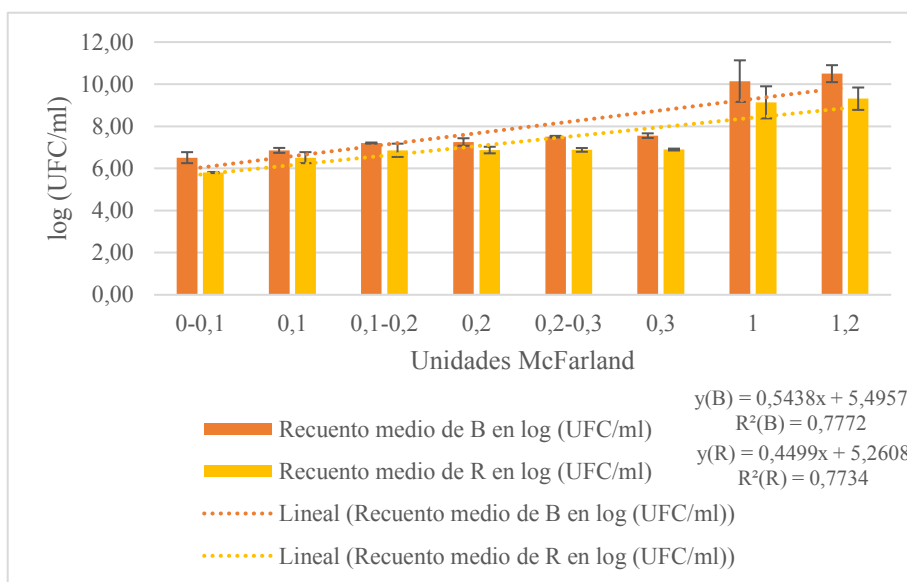


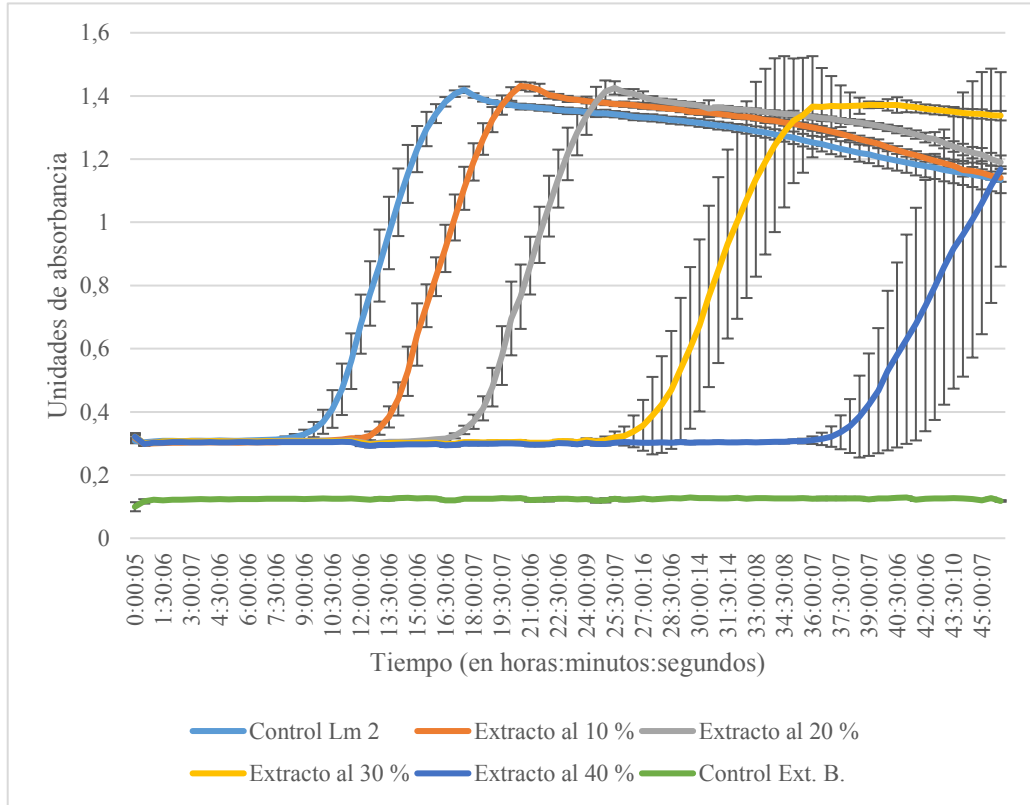
Figura 19. Resultados de la curva patrón entre turbidez en unidades McFarland y recuento en UFC/ml de *B* y *R*.

La recta de regresión mostró una correlación positiva entre la turbidez y el recuento, exhibiendo un coeficiente r de 0,95 para *R* y 0,91 para *B*. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por García et al. (2018), quienes también realizaron una curva de calibración entre log (UFC) y densidad óptica para *L. monocytogenes*. En el estudio obtuvieron una correlación lineal positiva ($r = 0,98$) para las variables absorbancia y log (UFC). La ecuación obtenida en el presente estudio permitió ajustar la concentración inicial de *B* y *R* de una forma fiable y rápida.

3.4 Cultivos de *L. monocytogenes* con un extracto libre de células de microorganismos con potencial anti-*Listeria*

Como se aprecia claramente en la **Figura 20-a**, el extracto de *B* afectó parcialmente al crecimiento de Lm 2. A más concentración de extracto, más se retrasaba su crecimiento, aunque en todos los casos, acababa alcanzando la misma carga que el control en la fase estacionaria. El tiempo de adaptación, por tanto, es lo que se vió comprometido, llegando a necesitar 30 horas con un 40 % de extracto. Esta observación complementa lo descrito por otros autores (Snoussi et al., 2018), quienes indicaron que la presencia de determinadas sustancias antimicrobianas, en especial, cuando se encontraban en concentraciones subinhibitorias, podían retrasar hasta horas la fase de latencia, aunque posteriormente se recuperaran y pudieran desarrollarse. La absorbancia del control del extracto no varió en el transcurso del tiempo de incubación, lo que indica que se esterilizó correctamente y que no hubo posterior contaminación de éste. En el resto de las combinaciones probadas, no se observó ningún efecto de la presencia del extracto sobre *L. monocytogenes* (**Figura 20 - b y 21 - a y b**) ya que las curvas de crecimiento se superpusieron entre ellas.

a)



b)

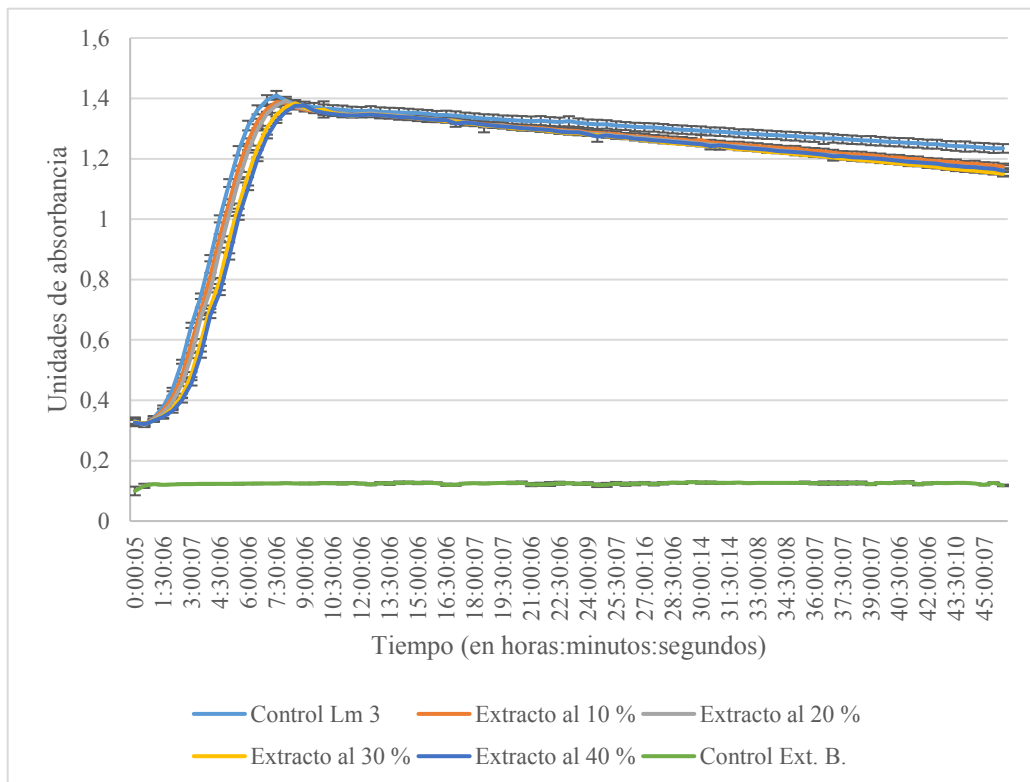
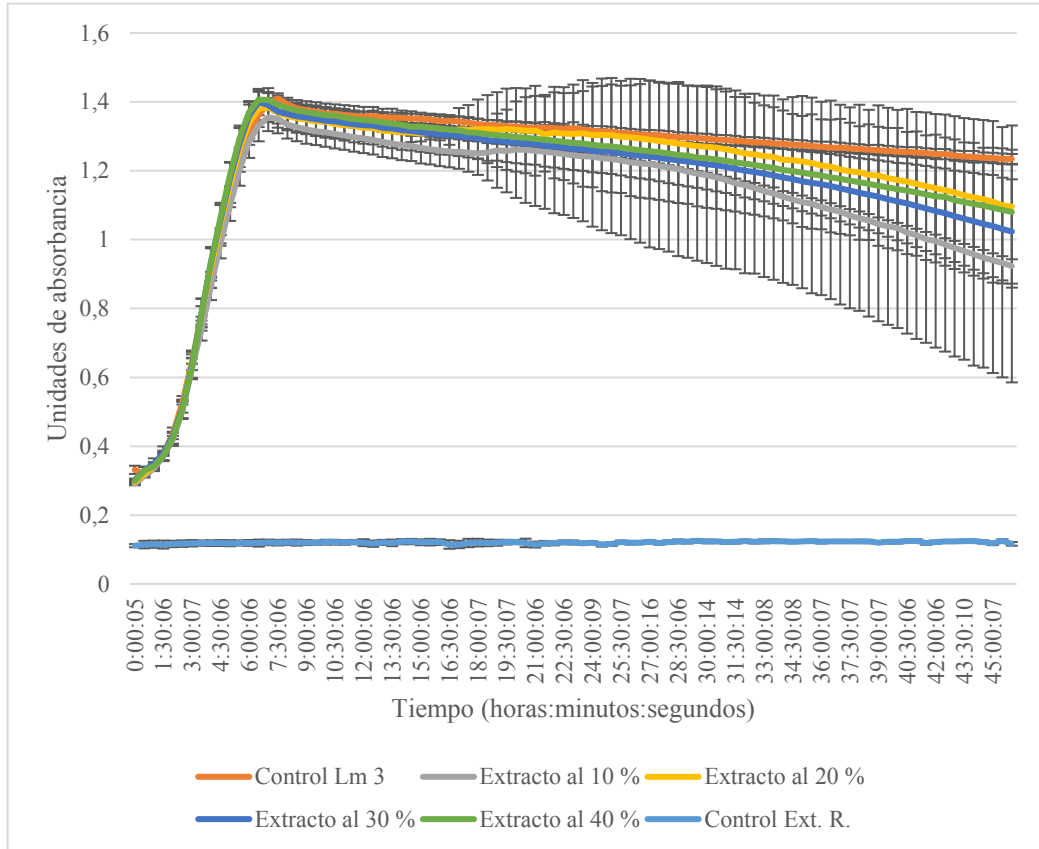


Figura 20. Evolución de la absorbancia de un cultivo de *Listeria monocytogenes* junto con un extracto de *B* libre de células a diferentes concentraciones (a 10, 20, 30, 40 %) mediante Bioscreen C: a) cepa 2; b) cepa 3, de Lm. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 9).

a)



b)

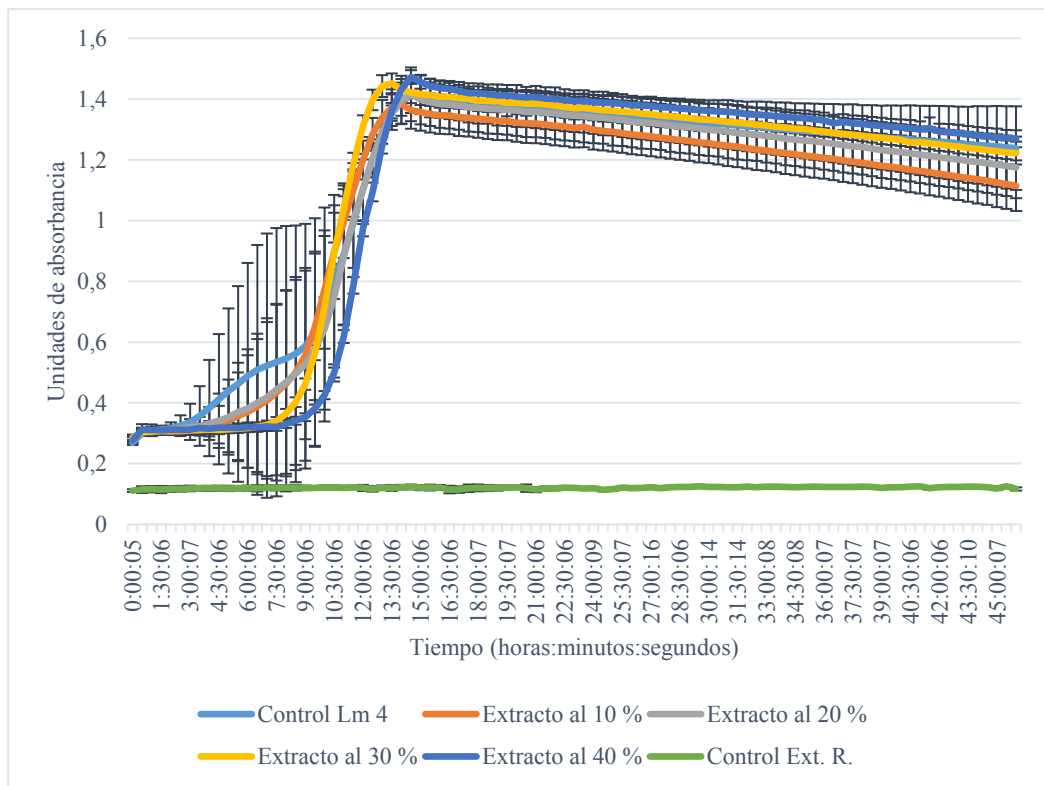


Figura 21. Evolución de la absorbancia de un cultivo de *Listeria monocytogenes* junto con un extracto de *R* libre de células de diferentes concentraciones (a 10, 20, 30, 40%) mediante Bioscreen C: a) cepa 3; b) cepa 4, de Lm. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 9).

Las concentraciones de recursos varían según el ambiente, implicando de esta manera que puedan aparecer interacciones de competencia entre microorganismos por estos recursos limitados. Al crecer y ganar en biomasa, los grupos microbianos se expanden en el espacio y compiten con otros para colonizar áreas que albergan más nutrientes. La competencia entre microorganismos puede ser: i) indirecta, consumiendo recursos (competencia pasiva); ii) directa, dañando a la otra cepa/especie presente (competencia activa) (Ghoul y Mitri, 2016). Para determinar la presencia de sustancias inhibidoras como bacteriocinas, otros autores han evaluado también el efecto de sobrenadantes a diferentes tiempos de incubación (Aguilar et al., 2011; Mariam et al., 2014). Aguilar et al. (2011) observaron, de hecho, con *L. plantarum* una reducción de 5 órdenes de magnitud logarítmica del crecimiento de *L. monocytogenes*.

Existen otras formas de obtener sobrenadantes de cultivo acelulares. Beristain-Bauza et al. (2017) generaron un sobrenadante libre de células de *L. sakei* centrifugando, filtrando, deshidratando y rehidratando en el momento de su utilización. Mariam et al. (2014) probaron también diferentes concentraciones de sobrenadantes libres de células obtenidos mediante centrifugación y filtrado (0,4 μm). En el presente estudio, no se centrifugó, pero se filtró con una membrana con diámetro de poro más reducido (0,22 μm) y se consiguió la esterilidad deseada, comprobada con el control de los extractos en los que no se apreció crecimiento microbiano.

3.5 Co-cultivos en medio líquido de *L. monocytogenes* con los mismos dos microorganismos

Al comprobar que los experimentos con los filtrados de *B* y *R* no demostraban ni sinergia ni antagonismo, se decidió realizar un experimento enfrentando, en medio líquido, las dos especies bacterianas aisladas, a diferentes cepas de *L. monocytogenes*.

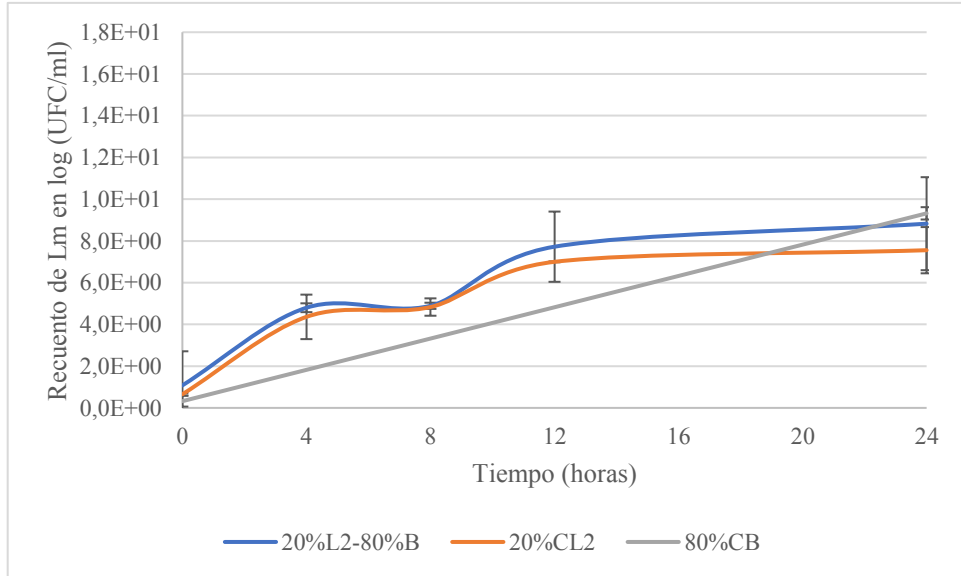
En la naturaleza, los microorganismos están generalmente rodeados de una amplia diversidad de especies, con las que compiten por nutrientes y espacio. En estas complejas condiciones, la evolución ha dado lugar a la aparición de múltiples fenotipos. Los microorganismos compiten así desplazando a sus vecinos, prescindiendo de genes costosos, obteniendo determinados productos de otros, neutralizando células cercanas y/o colonizando espacios antes de lo hagan otros competidores. Estos fenómenos son comunes, sin embargo, con el tiempo, la competencia disminuye localmente para dejar paso a una coexistencia

estable de distintos linajes (Ghoul y Mitri, 2016). La inhibición del crecimiento de microorganismos en cultivos mixtos es un proceso complejo, en el que interaccionan muchas variables (Aguilar et al., 2011; Quinto *et al.*, 2018). En este sentido, la restricción del crecimiento suele atribuirse a una acumulación de productos del metabolismo tóxicos, agotamiento de nutrientes esenciales, cambios de pH, potencial redox y producción de metabolitos antagonistas. Los nutrientes habitualmente esenciales para el crecimiento y las funciones metabólicas son el carbono, el nitrógeno, el fósforo, el azufre, el hidrógeno, el calcio, el hierro y otros metales (Ghoul y Mitri, 2016). Otros factores involucran las características del organismo y el requerimiento de cierto espacio físico. Todos estos factores pueden ser características únicas de interacción para cada co-cultivo (Aguilar et al., 2011).

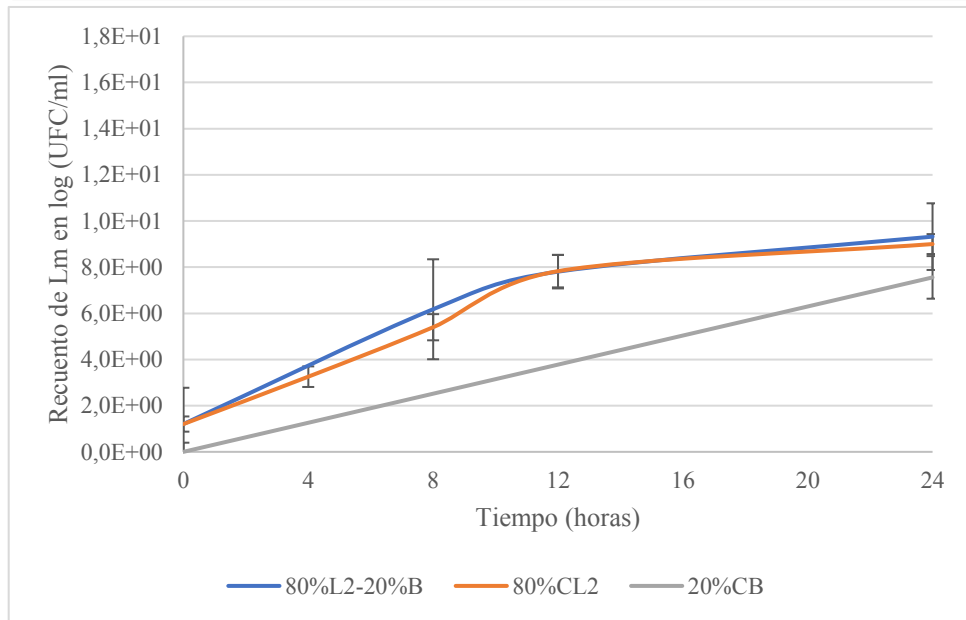
La competencia puede verse favorecida por tres condiciones: i) cuando las especies coexistentes necesitan recursos similares; ii) cuando las especies se mezclan en un espacio en el que compartirán nutrientes y secreciones; y iii) cuando la densidad es elevada en relación a los recursos disponibles. A largo plazo, las consecuencias de la competencia pueden ser: i) domina/n una o varias cepas/especies; ii) cada microorganismo se especializa en utilizar un recurso; iii) cada microorganismo se apodera de un espacio; iv) las especies aprovechan secreciones de las otras; v) las especies se agreden continuamente; y vi) las especies se defienden; siendo estos tres últimos comportamientos los menos conocidos (Ghoul y Mitri, 2016).

En la **Figura 22** se muestran todos los resultados de las diferentes combinaciones de co-cultivos probadas. Según el análisis estadístico, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el co-cultivo correspondiente a 20 % *L. monocytogenes* (cepa 2) – 80 % *B* y el control del patógeno, en el que, curiosamente, *L. monocytogenes* se vio favorecida en co-cultivo ($P < 0,05$). En el resto de las proporciones evaluadas, se puede ver que las curvas de crecimiento son similares entre sí y, de hecho, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$).

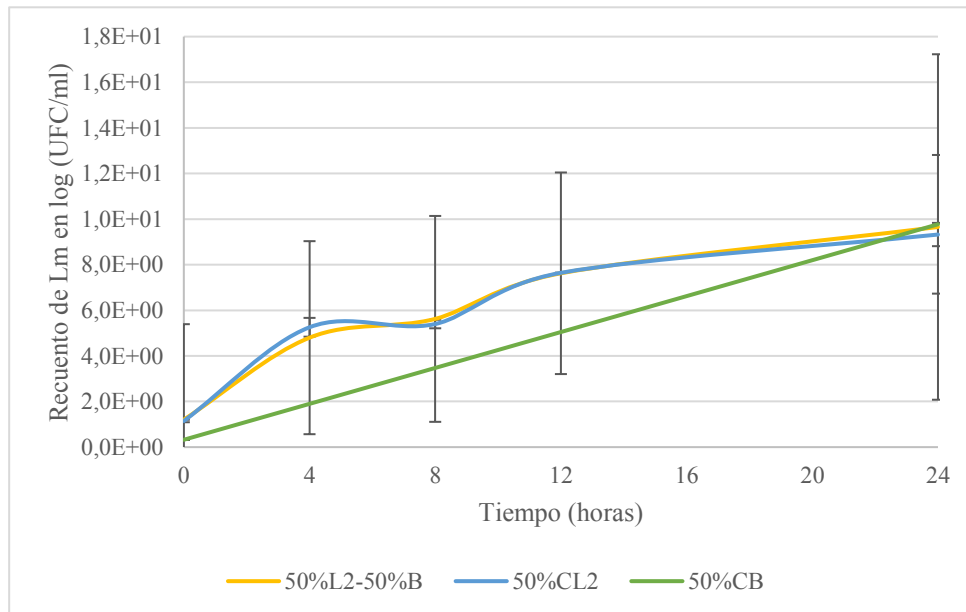
1)



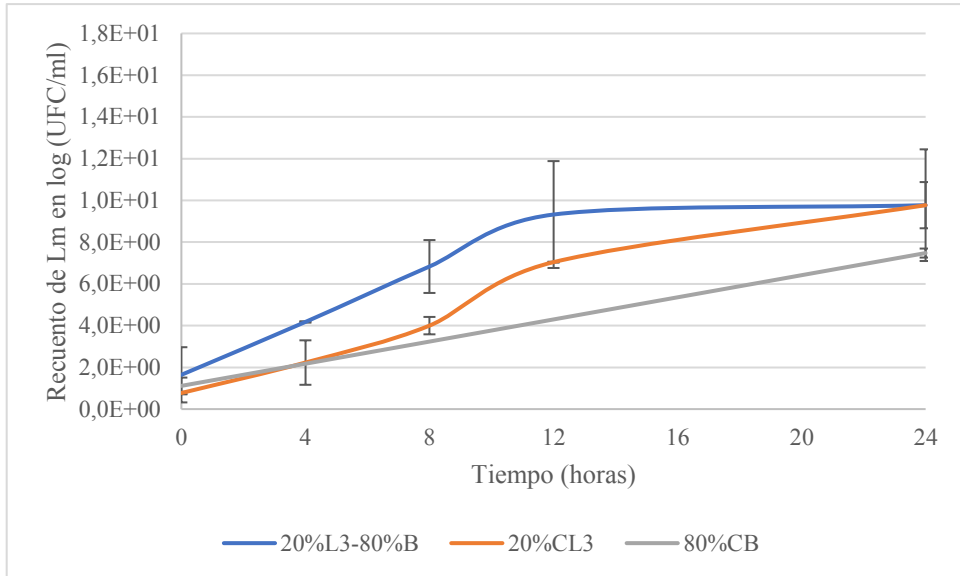
2)



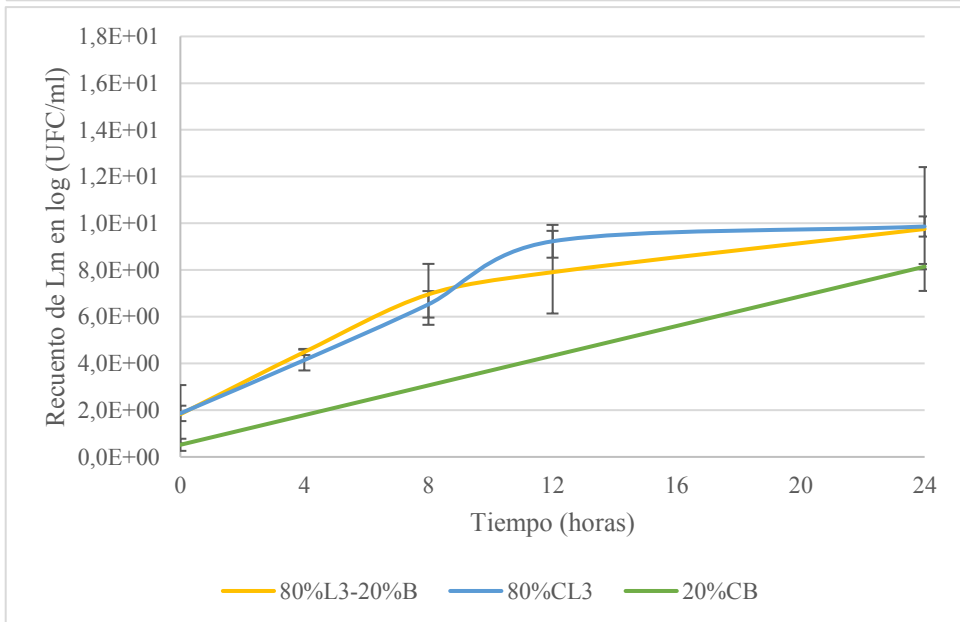
3)



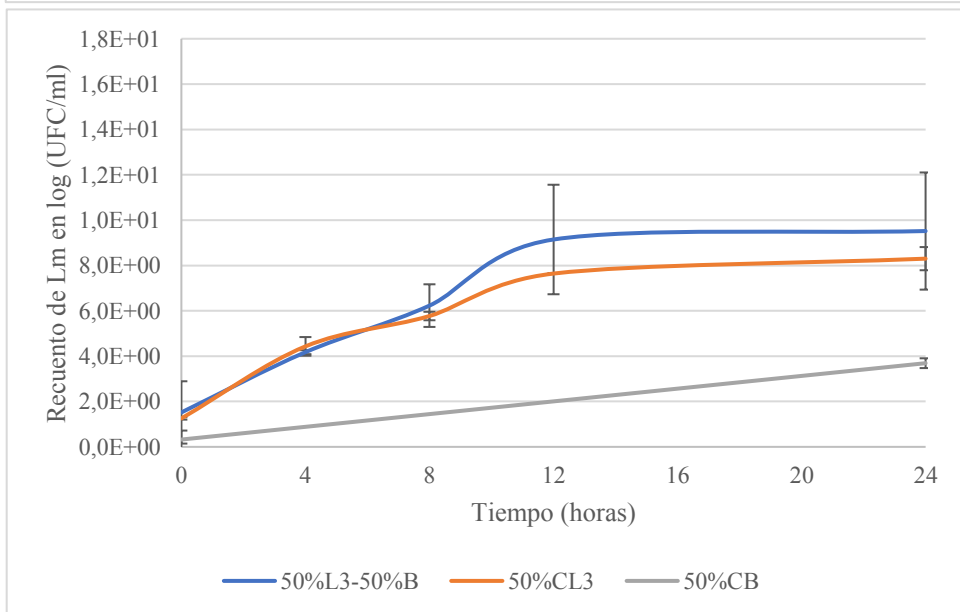
4)



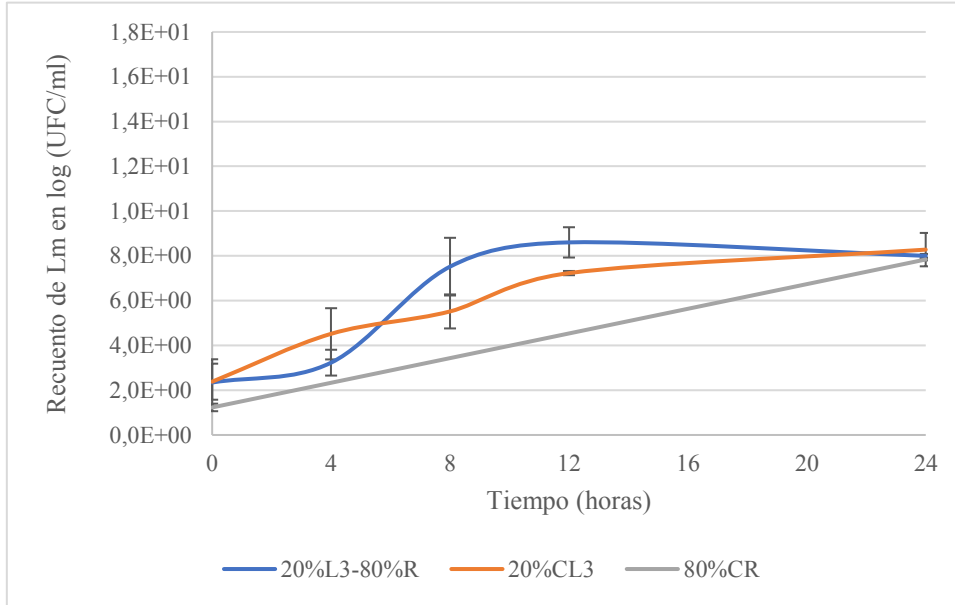
5)



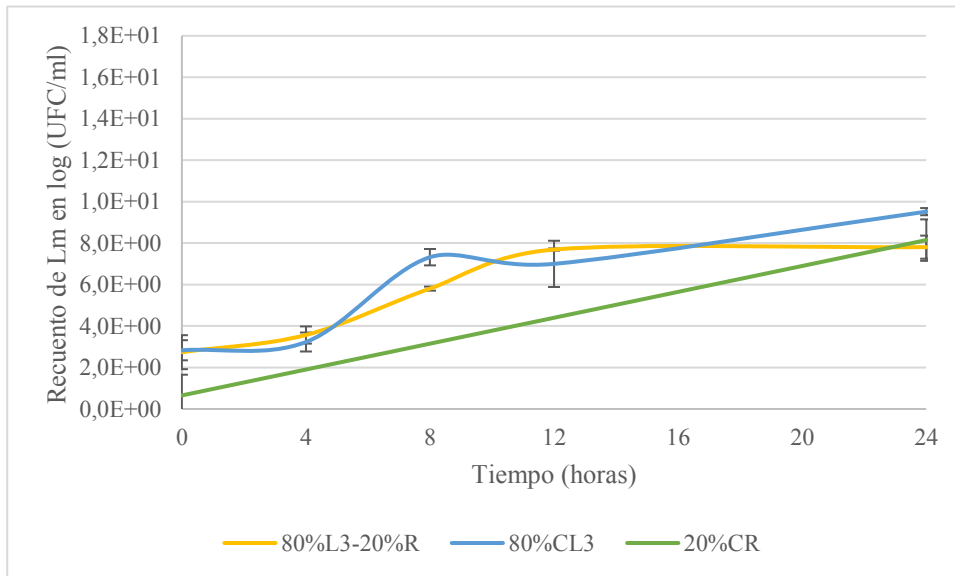
6)



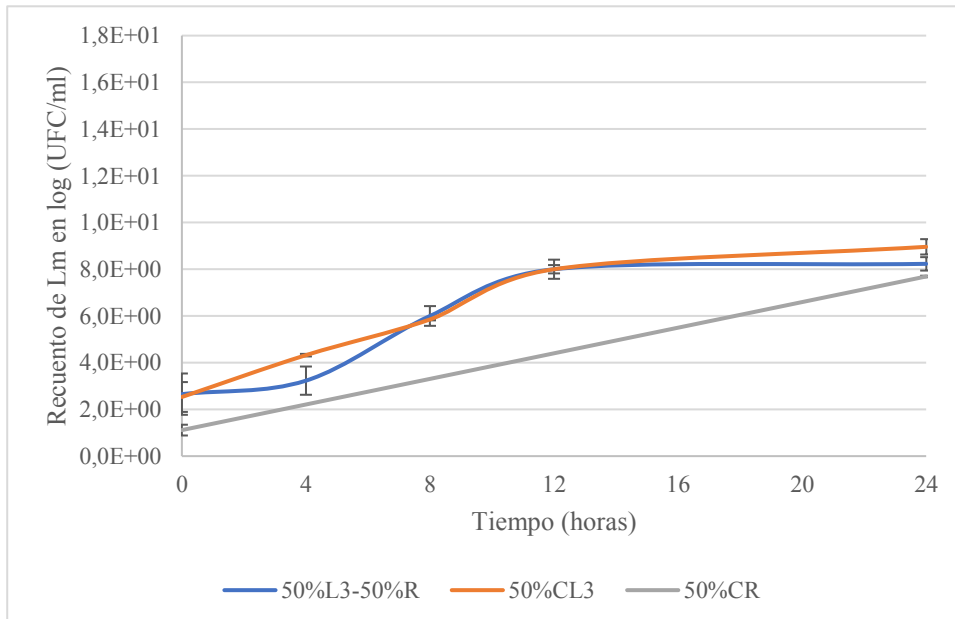
7)



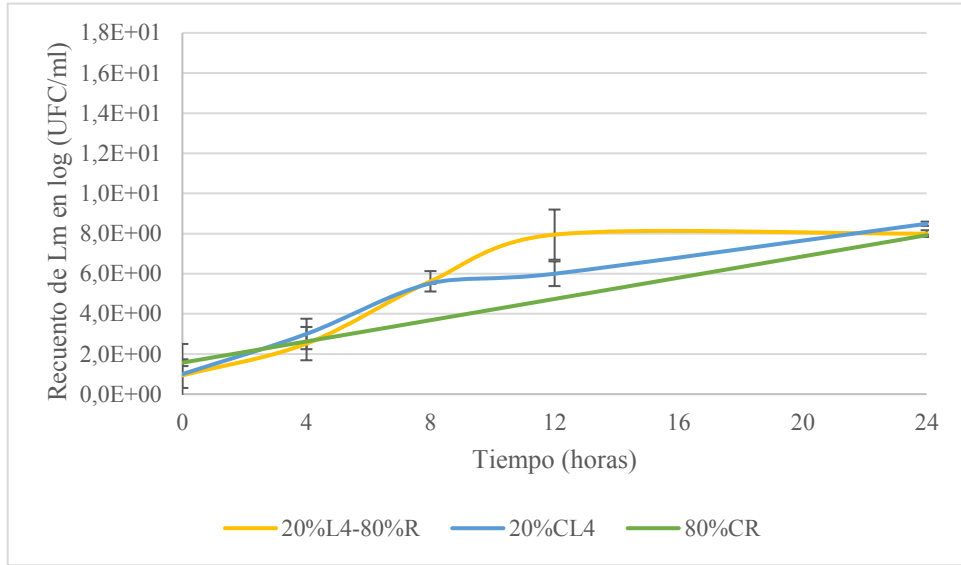
8)



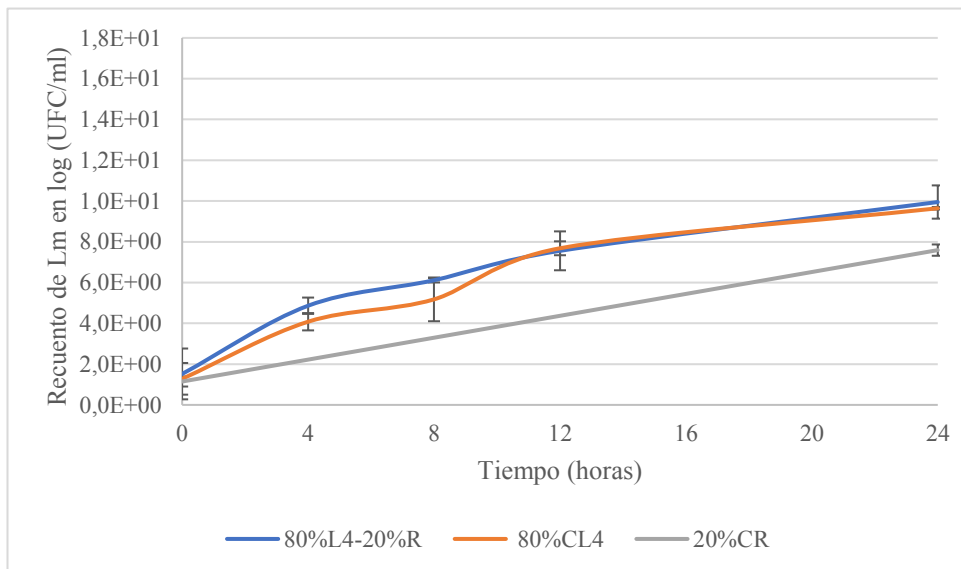
9)



10)



11)



12)

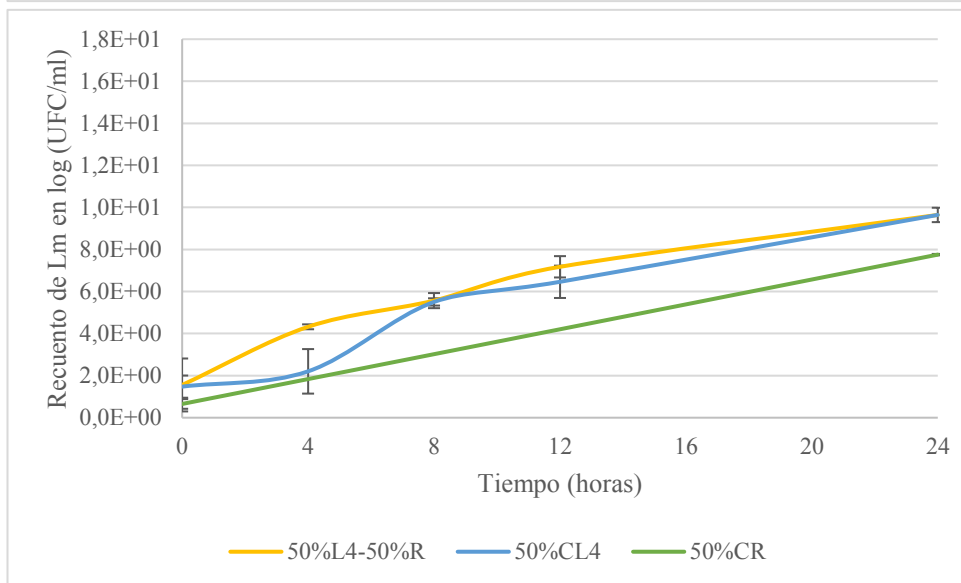


Figura 22. Recuentos de las diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* en las diferentes combinaciones

(1-12, codificadas en la Tabla 14) de co-cultivos con sus respectivos controles tanto del patógeno como de *B* y *R*. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Otros autores han realizado co-cultivos para evaluar el efecto de otros microorganismos sobre *L. monocytogenes* (Giraffa et al., 1995; Kemp, 2007; Akya et al., 2009; Aguilar et al., 2011; Asurmendi et al., 2015; Saraoui et al., 2016; Lianou et al., 2017; Vandera et al., 2017). Se han comparado, por ejemplo, curvas de crecimiento en co- y mono-cultivo de dúos “antagonista/patógeno” como *L. plantarum* y *L. monocytogenes* para valorar las interacciones entre microorganismos (Aguilar et al., 2011). García et al. (2018) también realizaron curvas de crecimiento de mono- y co-cultivos de *L. monocytogenes* con *L. plantarum*. La cinética de crecimiento fue evaluada determinando la viabilidad durante 48 horas en agares selectivos. Determinaron que *L. plantarum* es una alternativa para reducir el uso de aditivos químicos en el control de *L. monocytogenes*.

Los modelos de interacción son generalmente simples y están basados en conceptos bien establecidos como el efecto Jameson (Mellefont et al., 2008; Aguilar et al., 2011) o la ecuación de Lotka-Volterra, un modelo de competición general (Aguilar et al., 2011). El efecto Jameson describe que una cepa detiene su crecimiento cuando la otra ha alcanzado su concentración máxima. Estos modelos han sido utilizados en microbiología predictiva, para explicar interacciones entre *L. monocytogenes* y la microbiota natural de los alimentos (Guillier et al., 2008), particularmente, el efecto inhibitorio de las BAL sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* (Aguilar et al., 2011). En el presente estudio, no se observó ningún efecto que se ajuste a alguno de los modelos conocidos.

Muchos estudios atribuyen, a un menor crecimiento de una cepa, la producción de inhibidores específicos. No obstante, el efecto Jameson no es debido, en muchas ocasiones, a una interacción específica, sino que puede verse influenciado por la carga del inóculo inicial. En el presente estudio, las múltiples proporciones probadas deberían haber limitado este efecto asociado al diseño experimental. Mellefont et al. (2008) diferenciaron tres contextos, dependiendo del inóculo de la otra cepa, siendo este último de: i) más de 10^6 UFC/ml; ii) igual a 10^4 UFC/ml; y iii) menor a 10^3 UFC/ml. La mayoría de las combinaciones probadas pusieron de manifiesto, que la concentración inicial, había determinado qué especie iba a ser dominante y detuvo el crecimiento de la otra presente. *L. monocytogenes* se vio suprimida en todos los casos en que su inóculo era bajo. En cambio,

en el presente estudio, la cepa Lm 2 se vio favorecida estando en una proporción claramente desfavorable frente a *B*. Tampoco se vio afectada en el resto de situaciones en las que se puso a prueba, ya que no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) con su control correspondiente. Mellefont et al. (2008) concluyeron que una simple competición por nutrientes puede explicar la mayoría de las observaciones sin que haya una inhibición específica.

Según la revisión bibliográfica de Zilelidou y Skandamis (2018), los estudios con una misma especie en medio líquido o en una superficie abiótica no siempre generan los mismos resultados. Por ejemplo, entre *B. subtilis* y *L. monocytogenes*, en medio de cultivo líquido, se observa una supresión del crecimiento del patógeno, sin embargo, en acero inoxidable se observa una coexistencia en forma de biofilms. Los patrones de interacción parecen cambiar según el medio y las condiciones en las que se encuentran. Este fenómeno podría explicar por qué se observó una interacción (0/1) en agar y una interacción aparentemente contraria en caldo de cultivo, entre *B* y *L. monocytogenes*.

4. Conclusión parcial

Las interacciones entre comunidades bacterianas son complejas. La mayoría de los estudios sobre esta cuestión han sido realizados con una cepa de *L. monocytogenes* y otro microorganismo. Muy pocos estudios intentan recrear una comunidad microbiana multiespecie y ver, así, cómo los diferentes microorganismos interactúan entre sí, ya que son procedimientos difíciles de realizar. Las pruebas efectuadas han permitido cribar la presencia de especies potencialmente interesantes, *B* y *R*, por su interacción con *L. monocytogenes*. Como los comportamientos difieren de un medio a otro, el diseño de pruebas complementarias es clave para determinar el tipo de interacción que puede existir. Por ello, se debe comprobar qué efecto pueden tener estos microorganismos, muy presentes en la microbiota residente en la planta de procesado de cerdo ibérico bajo estudio, sobre *L. monocytogenes* en forma de biofilms. El conjunto de pruebas llevadas a cabo permitirá caracterizar mejor las interacciones entre microbiota residente en superficies y patógenos.

**VI. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BIOFILMS
PREFORMADOS DE *B* Y *R* SOBRE *LISTERIA*
*MONOCYTOGENES***

1. Planteamiento inicial

Los microorganismos *B* y *R* han mostrado tener algún tipo de interacción con diferentes cepas de *L. monocytogenes*, aisladas de una planta de procesado de cerdo ibérico. No obstante, se debe caracterizar el comportamiento de ambos microorganismos con este patógeno alimentario en forma de biofilms, estado en el que se encuentran la mayor parte del tiempo en una industria alimentaria (Stoodley et al., 2002).

El objetivo general fue evaluar el efecto de biofilms preformados de *B* y *R* en la adhesión y posterior desarrollo de biofilms de *L. monocytogenes*.

Para ello, se plantearon cuatro estudios experimentales, que pretendieron desarrollar los objetivos específicos:

- i) Comprobación de la capacidad para formar biofilms de *B* y *R*.
- ii) Evaluación del efecto de los biofilms preformados, por ambos microorganismos de interés, sobre 22 cepas de *L. monocytogenes*.
- iii) Validación del precedente diseño experimental valorando el efecto de biofilms preformados de *Pseudomonas* spp. y *C. zeylanoides*.
- iv) Caracterización del efecto de los biofilms de *B* y *R* sobre *L. monocytogenes*.

2. Materiales y métodos

2.1 Comprobación de la capacidad para formar biofilms de *B* y *R*

2.1.1 Superficie de estudio

En los cuatro estudios experimentales se utilizaron discos de acero inoxidable AISI 316 con grado 2B de 2 cm de diámetro y 1 mm de grosor. Antes de ser empleados, este material fue sometido a procedimientos de limpieza y desinfección. Los discos de acero inoxidable se limpiaron, primero, con un detergente no bactericida (ADIS Higiene, Madrid, España), después, se desinfectaron con isopropanol al 70 % (Panreac Química, Castellar del Vallès, España) y se dejaron secar en una cabina de flujo laminar (PV-30/70, Telstar, Terrasa, España). Todo ello, se realizó de acuerdo con la norma europea UNE-EN 13697:2015, relativa a materiales no porosos (AENOR, 2015). Para garantizar la esterilidad de los discos de acero inoxidable, se autoclavaron previamente durante 15 minutos a 121°C.

2.1.2 Preparación del inóculo

Después del aislamiento e identificación de las cepas, a partir del estudio ecológico de superficies de la planta de procesamiento de cerdo ibérico bajo estudio (ver Capítulo IV, sección 3.1), las cepas fueron liofilizadas. Previamente a su empleo, éstas se rehidrataron con 9 ml de TSB e incubadas a 30°C durante 40-48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron por el método de estría en superficie en TSA y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. A partir del cultivo, se sembraron colonias aisladas en tubos inclinados de TSA. Éstos se incubaron a 37°C durante 24 horas y se almacenaron a una temperatura de 4°C, conservándolos durante un periodo máximo de un mes. Los microorganismos se reactivaron mediante siembra por agotamiento en placas de TSA y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. A partir de estos cultivos, se prepararon los inóculos bacterianos para formar los biofilms. El inóculo se preparó transfiriendo múltiples colonias aisladas en TSB, hasta alcanzar una turbidez de 0,1 unidades McFarland, equivalente a aproximadamente 10^6 UFC/ml para ambos microorganismos, *B* y *R*. La suspensión bacteriana se diluyó decimalmente en tubos de agua de peptona de 9 ml. La concentración inicial del inóculo se determinó utilizando el sistema TEMPO.

2.1.3 Formación de biofilms monoespecie *in vitro*

Para la formación de biofilms monoespecie, se inocularon 50 µl de la suspensión bacteriana preparada en el centro de cada disco, dando como resultado una concentración de $2,3 \times 10^6$ UFC/cm² para *B* y $1,04 \times 10^6$ para *R*. Los discos se colocaron en placas de Petri estériles y, posteriormente, se introdujeron en una cámara húmeda, para ser incubados a 30°C, con el objetivo de promover el crecimiento bacteriano y la consecuente formación de biofilms (Fuster-Valls, 2006). Los biofilms se mantuvieron incubados en estas condiciones durante una semana ya que, según Ripolles-Avila et al., (2018a), este periodo es el necesario para generar, *in vitro*, biofilms maduros de *L. monocytogenes*, de forma que así se unificarían posteriormente los procedimientos experimentales. El mantenimiento de los biofilms se llevó a cabo con lavados y renovación de medio de nutrientes. Este proceso se realizó lavando los discos, con 3 ml de agua destilada estéril por duplicado, y aportando 50 µl de nuevo medio de cultivo TSB en los mismos. El objetivo de este protocolo fue favorecer el desarrollo de las células adheridas y consiguientemente, la formación de biofilms. Este mantenimiento se efectuó a los 2, 3, 6 y 7 días de incubación, imitando lo que ocurre en las industrias alimentarias en las que se higienizan las superficies y se trabaja, aportando nueva materia orgánica sobre éstas (Ripolles-Avila et al., 2018a).

2.1.4 Evaluación de la formación de biofilms mediante DEM

Después de la semana de incubación, los discos de acero inoxidable se lavaron dos veces con 3 ml de agua destilada estéril, para retirar todas aquellas células no adheridas. Posteriormente, se tiñeron con 5 µl de la tinción vital Live/Dead BacLight (Molecular Probes, Oregon, EE. UU.), y se mantuvieron protegidos de la luz, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Este kit emplea dos fluorocromos de ácidos nucleicos: SYTO 9 y yoduro de propidio. El primero es capaz de penetrar en todas las células, tanto con membranas lesionadas como intactas. En cambio, el segundo fluorocromo sólo penetra en las células con la membrana lesionada, produciendo una reducción del primer colorante aplicado (SYTO 9). De esta manera, las células viables, con membrana intacta, fluorescen en verde y las células muertas o lesionadas, en rojo. Después de la incubación, las superficies teñidas se evaluaron mediante DEM, utilizando un microscopio de epifluorescencia directa Olympus BX51/BX52 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con una lámpara de mercurio de 100 W (USH-103OL, Olympus), un filtro de doble paso (U-M51004 F/R – V2, Olympus) y

acoplado a una cámara digital (DP73, Olympus). Los discos se observaron con un objetivo de 20X, para comprobar que ambos microorganismos, *B* y *R*, eran capaces de formar biofilms. Se realizaron 10 fotografías por cada disco de 10 campos diferentes.

2.2 Evaluación del efecto de los biofilms preformados de los dos microorganismos de interés sobre 22 cepas de *L. monocytogenes*

2.2.1 Cepas de *L. monocytogenes* empleadas

Se utilizaron 22 cepas de *L. monocytogenes* (Tabla 16), obtenidas como cultivos liofilizados. Cinco procedían de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, Valencia, España), siendo: CECT 5366, CECT 5672, CECT 5873, CECT 911 y CECT 935. Doce de ellas, se aislaron por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid, España) de la misma industria de procesamiento de cerdo en una etapa anterior de estudio (A7, CDL69, EGD-e, P12, R6, S1(R), S1(S), S10-1, S2-1, S2-2 y S2^{bac}). Las otras cinco cepas fueron aisladas de las superficies de la industria cárnica colaboradora, como parte del proyecto nacional SURLIS (RTA2014-00045- C03-03): Lm 1, Lm 2, Lm 3, Lm 4 y Lm 5.

Tabla 16. Codificación y serotipos de las 22 cepas empleadas en este estudio (Ripolles-Avila, 2018).

Código	Cepa	Serotipo	Origen
1	4423	1/2a	Ortiz et al. (2016)
2	5873	1/2a	CECT
3	A7	1/2a	López et al. (2008)
4	CDL69	1/2a	Ortiz et al. (2016)
5	EGD-e	1/2a	Ortiz et al. (2016)
6	P12	1/2a	López et al. (2007)
7	R6	1/2a	López et al. (2013)
8	S1(R)	1/2a	Ortiz et al. (2014)
9	S1(S)	1/2a	Ortiz et al. (2014)
10	S2-1	1/2a	Ortiz et al. (2014)
11	S2-2	1/2a	Ortiz et al. (2016)
12	S2 ^{bac}	1/2a	Ortiz et al. (2014)
13	5366	4b	CECT
14	5672	4b	CECT
15	935	4b	CECT

16	S10-1	2a	Ortiz et al. (2016)
17	911	1/2c	CECT
18	Lm 1	4b	Aisladas de entorno cárnico industrial (2017) (Ripolles- Avila et al., 2019)
19	Lm 2	4b	
20	Lm 3	1/2a	
21	Lm 4	1/2a	
22	Lm 5	1/2b	

Las cepas liofilizadas fueron rehidratadas en 9 ml de TSB e incubadas a 30°C durante 40-48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron por el método de estría en superficie en TSA y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. A partir del cultivo, se resembraron colonias aisladas en tubos inclinados de TSA. Éstos se incubaron a 37°C durante 24 horas y se almacenaron a una temperatura de 4°C, conservándolos durante un periodo máximo de un mes.

2.2.2 Preparación de los inóculos

Como fue indicado en la sección 2.1.2 del presente capítulo, se prepararon los inóculos bacterianos para la posterior formación de biofilms de *B* y *R* por separado. La concentración inicial del inóculo preparado se determinó con el sistema TEMPO. Una semana después, se procedió a la inoculación de *L. monocytogenes* sobre los discos con los biofilms de ambos microorganismos formados (ver sección 2.2.3). Para ello, se realizó un nuevo cultivo de *L. monocytogenes* a partir de las cepas stock, mantenidas en tubos inclinados, mediante siembra por agotamiento en placas de TSA. Estas placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Se estimó la concentración microbiana inicial con el densitómetro DENSIMAT. Mediante este equipo se obtuvieron lecturas en unidades McFarland, con las que se pudo estimar la concentración, con una curva patrón previa (Ripolles-Avila, 2018). El inóculo se preparó transfiriendo múltiples colonias aisladas en TSB, hasta que se obtuvo una turbidez de 0,1 unidades McFarland, equivalente a aproximadamente 10^6 UFC/ml. La suspensión bacteriana se diluyó decimalmente en tubos de agua de peptona de 9 ml. La concentración inicial del inóculo, procedente de las distintas cepas de *L. monocytogenes*, se determinó utilizando placas de ALOA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

2.2.3 Formación de biofilms monoespecie *in vitro* y posterior implantación de *L. monocytogenes* en la estructura

Para la formación de los biofilms, se inocularon primero 50 µl de la suspensión bacteriana preparada de *B* y *R*, por separado, en el centro de cada disco. Los discos se colocaron en placas de Petri estériles y se incubaron en una cámara húmeda a 30°C. Los biofilms se mantuvieron durante una semana efectuando un lavado y renovación de nutrientes de los biofilms a los 2, 3, 6 y 7 días de incubación. Se siguió también el modelo de formación de biofilms *in vitro* con un periodo de incubación de una semana establecido por Ripolles-Avila et al. (2018a), siendo conforme con los resultados de otros autores que han indicado que los biofilms alcanzan una organización más compleja, una mayor densidad de células adheridas y una mayor producción de diferentes compuestos que conforman la matriz protectora al cabo de una semana de incubación (Di Bonaventura et al., 2008).

Una vez transcurrida la primeros siete días de incubación, se procedió al inóculo de las 22 cepas de *L. monocytogenes*. Se añadieron 30 µl de las suspensiones bacterianas preparadas de *L. monocytogenes* en todos los biofilms preformados de *B* y *R*. Además, se inocularon, al mismo tiempo, discos estériles para generar los controles, con también 30 µl de las suspensiones bacterianas iniciales. El mantenimiento de todos los biofilms, durante las 2 semanas, se llevó a cabo con el lavado y la renovación periódica del medio de nutrientes (Langsrud et al, 2016; Leriche y Carpentier, 2000). Este procedimiento se realizó lavando los discos, con 3 ml de agua destilada estéril por duplicado, y aportando 50 µl del medio de cultivo TSB en los discos de soporte a los biofilms mixtos y control de *B* y *R*; y 30 µl de TSB para los biofilms del grupo control de *L. monocytogenes*. Los biofilms mixtos y controles se incubaron una semana más en las mismas condiciones y con la misma frecuencia de lavados y aportación de nutrientes.

2.2.4 Cuantificación de biofilms mediante cultivo en agar ALOA, TEMPO y qPCR

Antes de cada análisis (a los 2 y 7 días de incubación), las superficies se lavaron por duplicado con 3 ml de agua destilada estéril, para descartar las células no adheridas, y a continuación, se colocaron en un frasco estéril que contenía 3,5 g de perlas de vidrio estériles y 9 ml de agua de peptona. Una vez introducidas las muestras en los frascos, éstos se agitaron con vórtex durante 1,30 minutos a 40 Hz, para desprender las células adheridas de la

superficie y así poder cuantificarlas. Este modelo de desprendimiento de microorganismos en forma de biofilms presenta una alta eficiencia de recuperación de células adheridas en superficie (AENOR, 2015; Fontecha-Umaña, 2014; Ríos-Castillo et al., 2017; Ripolles-Avila, 2018).

Previamente a la cuantificación de los biofilms biespecie, se comprobó que los microorganismos *B* y *R* no afectaban al recuento de *L. monocytogenes* en medios selectivos como PALCAM (Oxoid, Madrid, España) y ALOA. Sólo se obtuvieron resultados satisfactorios en ALOA, ya que *B* y *L. monocytogenes* se podían diferenciar claramente por la morfología de las colonias y la presencia de halo en el caso de *L. monocytogenes*. *R* no fue capaz de crecer en este agar. En PALCAM, no se pudieron diferenciar morfológicamente las colonias de los diferentes microorganismos. Por esta razón, las células que conformaron los biofilms, se cuantificaron mediante recuento en placas de ALOA y qPCR para *L. monocytogenes*, y sistema TEMPO para realizar un recuento total de microorganismos, así como de los controles de *B* y *R*.

Para el cultivo en agar ALOA y en sistema TEMPO, la suspensión resultante se diluyó decimalmente en tubos de agua de peptona de 9 ml. Se sembró, por diseminación en superficie con un asa de Digralsky estéril (Sudelab, Barcelona, España), 100 µl de la dilución correspondiente en placas de ALOA. Por otra parte, se transfirió 1 ml de la muestra a un vial, previamente hidratado con 3 ml de agua destilada estéril, para obtener el recuento total con el sistema TEMPO. El vial se agitó en vórtex, para homogeneizar su contenido, y se transfirió, a través de la unidad de llenado TEMPO, a la tarjeta para su posterior incubación. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y, las tarjetas TEMPO, a 30°C durante 48 horas. Después se realizaron los ajustes necesarios para expresar los resultados en log (UFC/cm²).

Para la cuantificación de *L. monocytogenes* mediante qPCR, se empleó el kit de detección de PCR IQ-Check *L. monocytogenes* II. A partir de las muestras no diluidas, se transfirieron 1,5 ml a distintos tubos Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y, a continuación, se centrifugaron mediante la centrífuga Heraeus Pico 17 (Thermo Scientific, Madrid, España) durante 5 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante obtenido se descartó y se añadieron 250 µl del reactivo de lisis en los tubos, se agitaron con vórtex durante 3 minutos y se colocaron en el bloque de calor a 95°C durante 20 minutos. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 12.000 rpm y se introdujeron 5 µl del sobrenadante de las muestras

procesadas, en los diferentes pocillos de tiras para la reacción y lectura. Previamente, en los pocillos se habían introducido 45 µl de la mezcla de PCR, que contenía los amplificadores y las sondas fluorescentes. Las tiras se sellaron con tapas ópticas y se introdujeron en el sistema MiniOpticon (Biorad, California, EE. UU.), obteniendo los resultados después de 70 minutos. Los valores de Ct obtenidos de cada muestra se analizaron usando el software CFX Manager (Biorad, California, EE. UU.) y se hicieron los respectivos cálculos, mediante el empleo de una curva patrón (Ripolles-Avila, 2018), para obtener los valores de recuento.

2.3 Evaluación del efecto de los biofilms preformados de *Pseudomonas* spp. y *Candida zeylanoides* sobre *L. monocytogenes*

La metodología empleada, tanto para la preparación del inóculo como la formación y cuantificación de biofilms, fue la misma que la mencionada en la sección 3.2 del presente capítulo. Las únicas diferencias se encuentran en:

- i) Las cepas utilizadas para este estudio que fueron Lm 2, Lm 3 y Lm 4 con *C. zeylanoides*, *P. fluorescens* y *P. luteola*, estos últimos siendo aislados de la misma planta de procesado de cerdo ibérico que las cepas de *L. monocytogenes* empleadas.
- ii) La cuantificación de los microorganismos, recurriendo únicamente a las placas de ALOA para *L. monocytogenes*, el sistema TEMPO para los recuentos totales y de *Pseudomonas* spp. y la siembra, por diseminación en superficie con un asa de Digralsky estéril, de 1 ml de las suspensiones resultantes en agar Sabouraud para el recuento de *C. zeylanoides*.

2.4 Caracterización del efecto de los biofilms preformados de *B* y *R* sobre *L. monocytogenes*

Para comprender el efecto de los biofilms preformados de *B* y *R*, se decidió analizar el agua resultante de los lavados de las muestras. La metodología seguida para la preparación de los inóculos, la formación y la cuantificación de los biofilms fue idéntica a la mencionada en la anterior sección 3.2.

Las únicas modificaciones realizadas conciernen:

- i) Las cepas empleadas siendo Lm 2, Lm 3, Lm 4 y Lm 5.

- ii) La cuantificación de los microorganismos con el cultivo en ALOA para *L. monocytogenes* y el sistema TEMPO para el recuento total de microorganismos.
- iii) El análisis del agua de los lavados (no realizado en los anteriores estudios), en el que se recuperaba los 6 ml de agua de lavado en frascos estériles y se procedía al recuento de *L. monocytogenes* en placas de ALOA con la siembra de 1 ml de las muestras y del total de microorganismos presentes mediante el sistema TEMPO.

2.5 Análisis estadístico

Para empezar, se realizó un análisis exploratorio de los datos y se efectuó la prueba de *Shapiro-Wilk*, para contrastar la normalidad de los conjuntos de datos (recuentos por cada cepa y tiempo), mediante el paquete de software estadístico SPSS Statistics IBM 23. Los recuentos bacterianos obtenidos se convirtieron a valores logarítmicos decimales, para reducir la variabilidad de los ensayos microbiológicos. Para analizar los resultados de cada experimento, se recurrió al software estadístico GraphPad Prism. Como todos los conjuntos de datos eran compatibles con una distribución normal ($P > 0,05$), se ejecutó un ANOVA de dos vías para evaluar por cada cepa y tiempo de análisis, las diferencias en el recuento de los cultivos mixtos y sus respectivos controles, tanto para *L. monocytogenes* como para el resto de los microorganismos empleados, con un nivel de significación de 5,0 %, es decir, $P < 0,05$, para el análisis de todos los datos. Se realizó un contraste *a posteriori* mediante la prueba de Tukey.

3. Resultados y discusión

3.1 Evaluación de la capacidad para formar biofilms de *B* y *R*

Como muestra la **Figura 23**, los microorganismos *B* y *R* fueron capaces de formar biofilms maduros una vez transcurrida la primera semana de incubación. Se observó la presencia, tanto de células viables (en verde), lesionadas (en rojo) como de material extracelular (color anaranjado) y compatible con la estructura común de los biofilms (Phillips, 2016; Stoodley et al., 2002). Se ha sugerido que un indicador de la estructura de biofilms, en estado maduro, podría ser la existencia de huecos intersticiales, lo que podría representar canales de agua para el paso de nutrientes y eliminación de residuos (Ripolles-Avila, 2018a). De acuerdo con nuestros resultados, se observaron estos canales para ambos microorganismos, revelando pues una estructura compleja y organizada. Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que estos microorganismos fueron aislados de biofilms salvajes formados en los sensores SCH de diferentes superficies de la planta de procesado de cerdo ibérico bajo estudio.

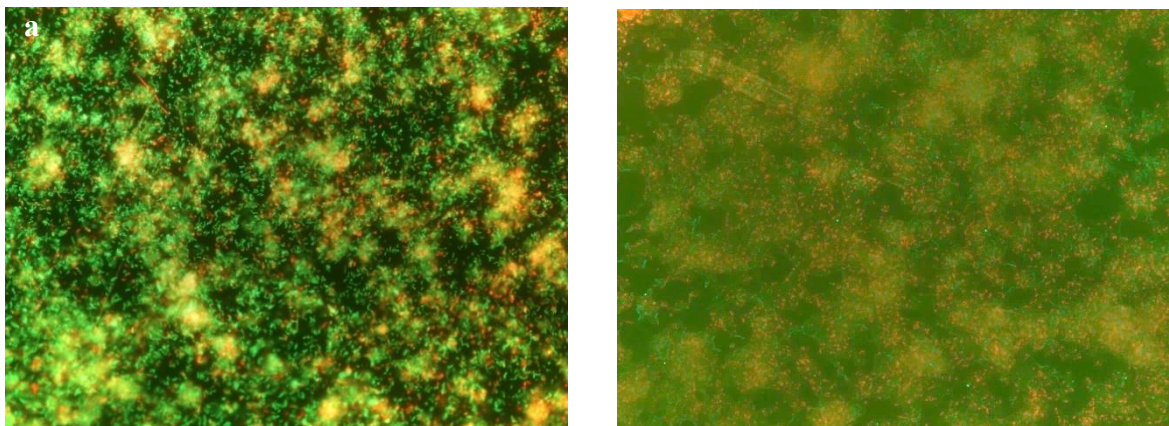


Figura 23. Ejemplos de fotografías de los biofilms formados a una semana de incubación por a) *B* y b) *R*, observados con tinción Live-Dead BacLight mediante microscopía de epifluorescencia directa (objetivo de 20x). Nótese la cantidad de matriz de EPS producida por *R*.

Se consideró esencial realizar esta comprobación, antes de seguir con la investigación, ya que no todos los microorganismos son capaces de formar biofilms. *Campylobacter* spp., por ejemplo, no suele formar biofilms propios y consigue persistir en entornos de procesado de alimentos invadiendo biofilms formados por otras bacterias (Phillips, 2016).

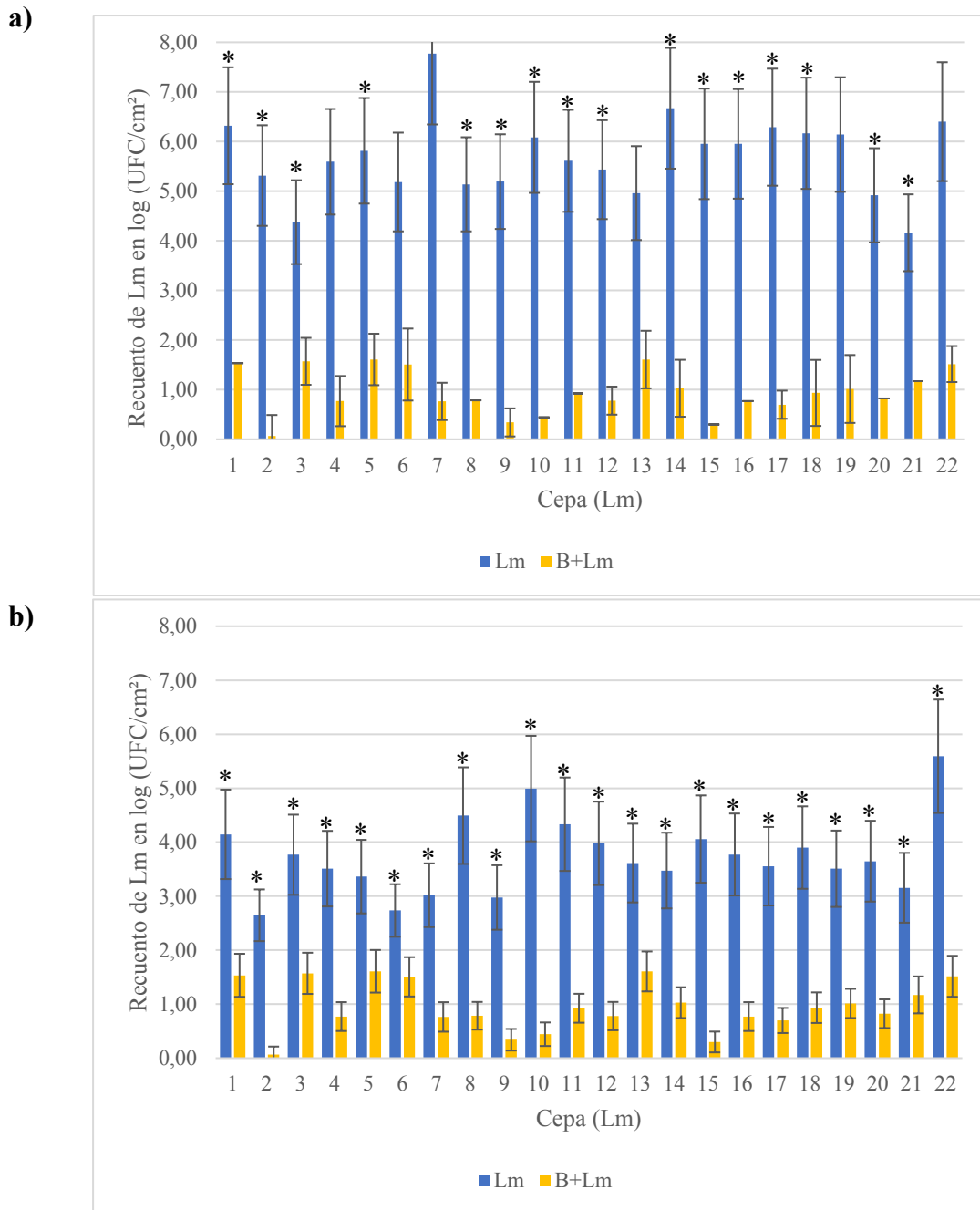
3.2 Evaluación del efecto de los biofilms preformados de los dos microorganismos de interés sobre 22 cepas de *L. monocytogenes*

Los biofilms se analizaron a los 2 y 7 días de incubación para valorar: i) la capacidad de implantación de *L. monocytogenes*; y ii) el recuento final de *L. monocytogenes* transcurrida una semana de incubación, para ver si este patógeno era capaz de formar biofilms maduros en estas condiciones.

Se partió de una inoculación media de $3,75 \times 10^5$ UFC/ml para *B*; $1,37 \times 10^6$ UFC/ml para *R* y $2,51 \times 10^5$ UFC/ml de media para las cepas de *L. monocytogenes*. Se presenta, en las **Figura 24 y 25**, la media de los recuentos de *L. monocytogenes* en agar ALOA a partir de la extracción de los biofilms en los controles y mixtos.

En presencia de biofilms preformados de *B*, la tendencia que se constató fue que los recuentos de todas las cepas de *L. monocytogenes* disminuían notablemente respecto a los biofilms monoespecie controles tanto a los 2 días como a los 7 días de incubación (**Figura 24 – a y b**). A nivel estadístico, los recuentos obtenidos de *L. monocytogenes* tras los 2 días de incubación mostraron, que 16 de las cepas, obtuvieron una carga significativamente inferior en biofilms mixtos con *B* en comparación con sus controles (cepa 1, $P = 0,00$; cepa 2, $P = 0,00$; cepa 3, $P = 0,01$; cepa 5, $P = 0,00$; cepa 8, $P < 0,0001$; cepa 9, $P = 0,00$; cepa 10, $P < 0,0001$; cepa 11, $P < 0,0001$; cepa 12, $P = 0,00$; cepa 14, $P = 0,00$; cepa 15, $P = 0,01$; cepa 16, $P < 0,0001$; cepa 17, $P = 0,00$; cepa 18, $P = 0,01$; cepa 20, $P = 0,00$; cepa 21, $P < 0,0001$). Asimismo, a los 7 días tras la inoculación del patógeno, todas las cepas presentaron un valor de $\log(\text{UFC}/\text{cm}^2)$ significativamente más bajo respecto a sus controles respectivos (cepa 1, $P = 0,00$; cepa 2, $P = 0,00$; cepa 3, $P = 0,00$; cepa 4, $P < 0,0001$; cepa 5, $P = 0,00$; cepa 6, $P = 0,00$; cepa 7, $P < 0,0001$; cepa 8, $P = 0,00$; cepa 9, $P < 0,0001$; cepa 10, $P < 0,0001$; cepa 11, $P = 0,00$; cepa 12, $P < 0,0001$; cepa 13, $P = 0,00$; cepa 14, $P = 0,00$; cepa 15, $P < 0,0001$; cepa 16, $P < 0,0001$; cepa 17, $P < 0,0001$; cepa 18, $P < 0,0001$; cepa 19, $P < 0,0001$; cepa 20, $P = 0,00$; cepa 21, $P < 0,0001$; cepa 22, $P = 0,00$).

En las **Figuras 24 – a y b**, se aprecia una reducción evidente al inocular biofilms mixtos del patógeno con *B*. Por ello, sería importante incrementar el número de repeticiones, en estudios posteriores, con el fin de reducir la variabilidad detectada en el número de células adheridas, en los biofilms desarrollados en laboratorio.



El símbolo * indica la significación entre el grupo y su control respectivo.

Figura 24. Recuento de las células que conformaron los biofilms de las 22 cepas de *Listeria monocytogenes* control y mixtos: a) a los 2 días; y b) a los 7 días de incubación con *B.* Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 6).

Múltiples estudios han evaluado la capacidad de biocontrol de *L. monocytogenes* mediante, en su mayoría, con bacterias del ácido láctico como *L. sakei*, que puede producir bacteriocinas (Coughlan et al., 2016). Winkelströter et al. (2011), por ejemplo, evaluaron la formación de biofilms de *L. monocytogenes* en presencia de una cepa de *L. sakei* y del

sobrenadante libre de células de este microorganismo, conteniendo sakacina. La presencia de *L. sakei* y el sobrenadante con bacteriocina, fueron eficaces en la inhibición de las fases iniciales de formación del biofilm de *L. monocytogenes*, ya que se observó una disminución en el número de células adheridas presentes en los discos de acero inoxidable. Sin embargo, después de 48 horas de incubación, se observó un nuevo crecimiento de *L. monocytogenes* en el cultivo que contenía sakacina. Por consiguiente, la actividad inhibidora de esta bacteriocina no fue suficiente para ejercer un control definitivo del patógeno estudiado. En un estudio similar, Pérez-Ibarreche et al. (2016) investigaron el efecto de otra cepa de *L. sakei*, también productora de una bacteriocina, sobre biofilms formados por *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable y politetrafluoroetileno, materiales de uso habitual en las industrias. Esta cepa de *L. sakei* fue, a su vez, efectiva en la inhibición de biofilms. Los autores sugirieron que el tratamiento previo de los equipos de procesamiento de alimentos con *L. sakei* o su bacteriocina, podían representar un posible método para prevenir la adhesión de *L. monocytogenes* a las superficies.

No parece que se haya confrontado directamente, en otros estudios, a *B* y *L. monocytogenes*. No obstante, *Brevibacillus* spp. muestra ser un género especialmente interesante para el biocontrol de patógenos de plantas y otros microorganismos de transmisión alimentaria. En virtud de ello, se ha demostrado que la cepa *B* Nagano es, por ejemplo, capaz de producir una bacteriocina llamada gramicidina S, eficaz frente a un patógeno de plantas, *Botrytis cinerea* (Edwards y Seddon, 2001). Song et al. (2012) identificaron también un nuevo péptido antibacteriano que denominaron tostadina, soluble en agua, capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*. Asimismo, otra bacteriocina llamada Bac-GM100 fue identificada a partir de *B*. Se determinó que Bac-GM100 fue extremadamente estable al calor (20 minutos a 120°C) y se mantuvo además estable dentro de un rango de pH desde 3 a 10. Se trata de una proteína dado que se mostró sensible a varias proteasas. Esta bacteriocina ha manifestado tener acción bactericida contra bacterias Gram negativas (*S. enterica*, *P. aeruginosa* y *Agrobacterium tumefaciens*) y Gram positivas (*E. faecalis* y *S. aureus*), así como fungistático contra el hongo *Candida tropicalis* (Ghadbane et al., 2013). Otras especies del género *Brevibacillus* spp. son también capaces de producir sustancias antimicrobianas. La taoramamida, un lipopéptido antibacteriano, fue aislado de *Brevibacillus laterosporus* (Desjardine et al., 2007). Por último, Wu et al. (2005) identificaron una sustancia antibiótica, llamada BT, refiriéndose a un grupo de péptidos producidos por *Brevibacillus texasporus* en respuesta a una limitación de nutrientes. Hoy en

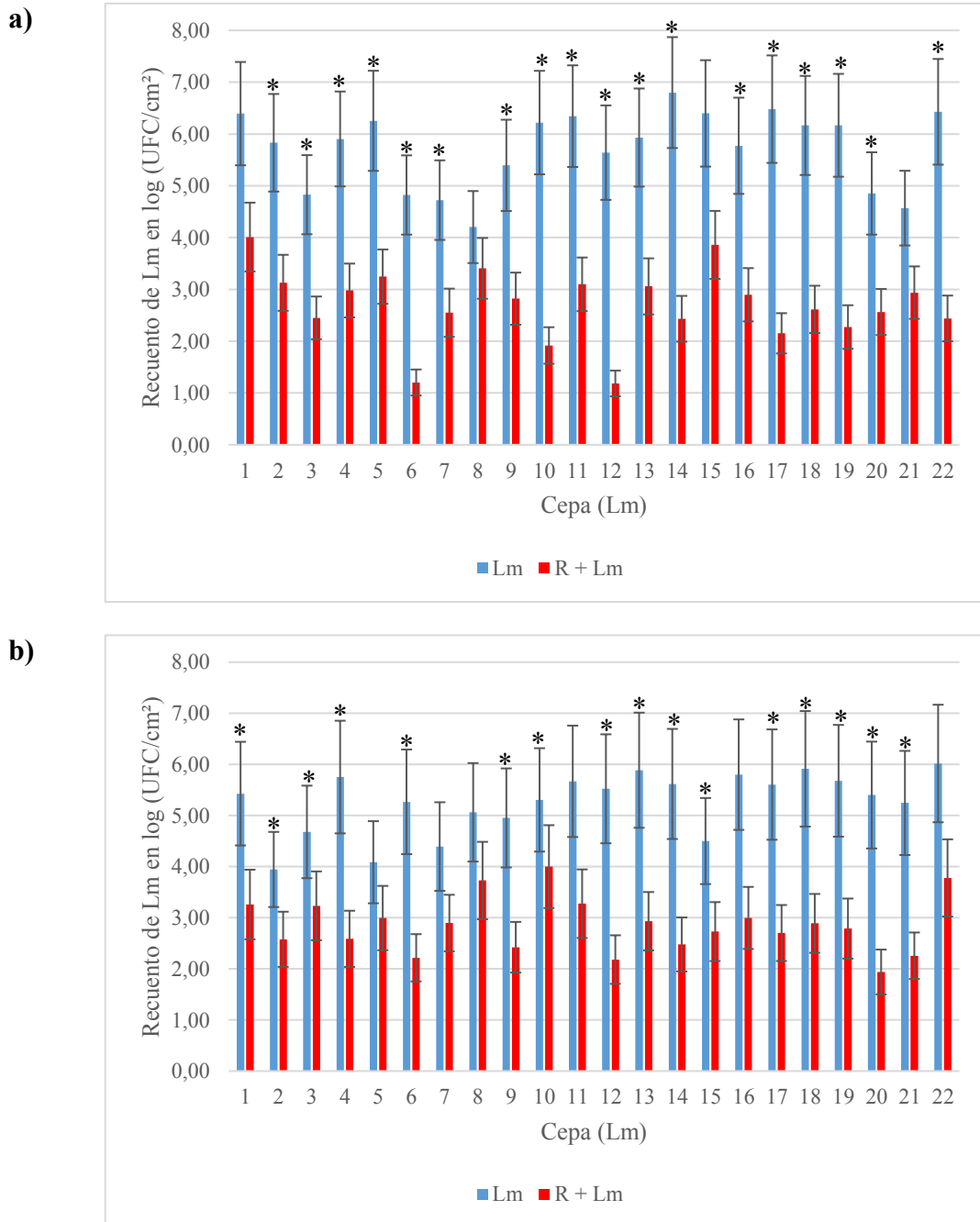
día, hay una búsqueda activa de alternativas de higienización a aplicar en la industria alimentaria, destacando entre ellas aquellas estrategias ecológicas que minimicen el impacto medioambiental. En este sentido, los resultados del presente estudio han demostrado tener la relevancia suficiente como para poder ser potencialmente trasladados a un entorno industrial y comprobar, por consiguiente, su efectividad en condiciones reales.

Los serotipos de *L. monocytogenes* que mostraron sensibilidad a la presencia de *B* fueron 1/2a, 1/2c y 4b ($P < 0,05$); los serotipos 2a y 1/2b se veían afectados, pero no de forma significativa ($P = 0,33$ y $P = 0,23$, respectivamente). Se ha observado que las estructuras poblacionales generadas en biofilms de *L. monocytogenes* por distintos serotipos pueden diferir enormemente (Dunn et al., 2009). En este sentido, es interesante destacar que los resultados obtenidos a nivel de serotipo podrían tener una aplicación relevante a nivel industrial, ya que el serotipo 1/2a es el que se aísla con más frecuencia en muestras de alimentos y ambientales (Ortiz et al., 2010), y el serotipo 4b es el que se relaciona con la mayoría de los brotes de listeriosis asociados con alimentos (López et al., 2007).

Los recuentos de *B* (resultados no mostrados), obtenidos a través de la diferencia entre el recuento total de microorganismos y el recuento específico de *L. monocytogenes*, no presentaron diferencias significativas con el control ($P > 0,05$). Su carga no se vio afectada, en ninguno de los análisis, por la inoculación de las diferentes cepas del patógeno. Todo ello demuestra como este microorganismo, una vez genera un biofilm maduro y constituye una organización compleja del mismo, puede llegar a ser constante en el tiempo. De hecho, este podría ser uno de los factores influyentes en la no implantación de patógenos en las superficies de trabajo, lo que revela un campo prometedor de estudio.

En la prueba realizada con *R*, la tendencia observada fue parecida al caso anterior, la población de *L. monocytogenes* disminuyó en los biofilms mixtos *versus* los biofilms controles, tanto a los 2 como a los 7 días (**Figura 25**). A nivel estadístico, 18 cepas exhibieron diferencias significativas al cabo de 2 días de incubación (cepa 2, $P = 0,03$; cepa 3, $P = 0,03$; cepa 4, $P = 0,00$; cepa 5, $P = 0,00$; cepa 6, $P = 0,00$; cepa 7, $P = 0,03$; cepa 9, $P = 0,04$; cepa 10, $P = 0,01$; cepa 11, $P = 0,00$; cepa 12, $P = 0,00$; cepa 13, $P = 0,00$; cepa 14, $P = 0,00$; cepa 16, $P = 0,00$; cepa 17, $P = 0,00$; cepa 18, $P = 0,00$; cepa 19, $P = 0,02$; cepa 20, $P = 0,03$; cepa 22, $P = 0,00$). Al cabo de una semana de incubación, 16 cepas manifestaron diferencias significativas *versus* su control (cepa 1, $P = 0,01$; cepa 2, $P = 0,01$; cepa 3, $P = 0,02$; cepa 4, $P = 0,00$; cepa 6, $P = 0,02$; cepa 9, $P = 0,01$; cepa 10, $P = 0,00$; cepa

12, $P = 0,01$; cepa 13, $P = 0,01$; cepa 14, $P = 0,02$; cepa 15, $P = 0,03$; cepa 17, $P = 0,02$; cepa 18, $P = 0,03$; cepa 19, $P = 0,01$; cepa 20, $P = 0,01$; cepa 21, $P = 0,00$). Los recuentos de R (resultados no mostrados) tampoco se vieron afectados, en ningún momento, por la integración de *L. monocytogenes* ($P > 0,05$).



El símbolo * indica la significación entre el grupo y su control respectivo.

Figura 25. Recuento de las células que conformaron los biofilms de las 22 cepas de *Listeria monocytogenes* control y mixtos: a) a los 2 días; y b) a los 7 días de incubación con R . Las barras de error representan el error estándar de la media ($n = 6$).

En vista de los resultados obtenidos y de los que han observado otros autores, se plantearon dos hipótesis en cuanto al efecto que podrían ejercer los biofilms preformados de estos microorganismos sobre *L. monocytogenes*: i) hipótesis de competencia inespecífica: los biofilms preestablecidos de otros microorganismos afectan a la implantación del patógeno en la superficie, al ocupar el espacio disponible; y ii) hipótesis de competencia específica: los microorganismos preexistentes afectan al desarrollo del biofilm de *L. monocytogenes* al competir por nutrientes o al producir sustancias anti-*Listeria* (bacteriocinas, anti-QS, enzimas, entre otras) (Giaouris y Simões, 2018; Pérez-Ibarreche et al., 2016; Puga et al., 2018b). En este sentido, *B. subtilis* es capaz de producir enzimas que degradan las moléculas empleadas para QS de *V. cholerae*, impidiendo su posterior formación de biofilms (Ghoul y Mitri, 2016). Leriche y Carpentier (2000) estudiaron también el efecto de un biofilm mixto de *S. sciuri* sobre *L. monocytogenes*. Observaron que la matriz extracelular de polisacáridos de *S. sciuri* modificaba el balance entre fase planctónica y en forma de biofilm del patógeno, prevaleciendo así en la forma libre. La competencia por los nutrientes asociado a las propiedades anti-adhesivas de *S. sciuri* podrían explicar la disminución en los recuentos de *L. monocytogenes*. Se ha descrito, además, que este microorganismo posee una alta actividad proteolítica lo que podría haber afectado la matriz de *L. monocytogenes* (Leriche y Carpentier, 2000). De hecho, se ha demostrado que la ADNasa y la proteinasa K son eficaces contra biofilms de *L. monocytogenes*. Asimismo, la adición de proteinasa K inhibió completamente la formación de biofilms (Nguyen y Burrows, 2014).

Estos resultados hacen necesario continuar con los estudios que permitan demostrar el mecanismo de acción. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis sí que han demostrado que el efecto no se debe a sustancias liberadas a medio, ya que no se detectó eficacia real de soluciones filtradas libres de células, Por ello, habría que pensar en componentes celulares de *B* o sustancias liberadas en la matriz polimérica de esta bacteria, que sólo se liberen en el biofilm y no en caldos.

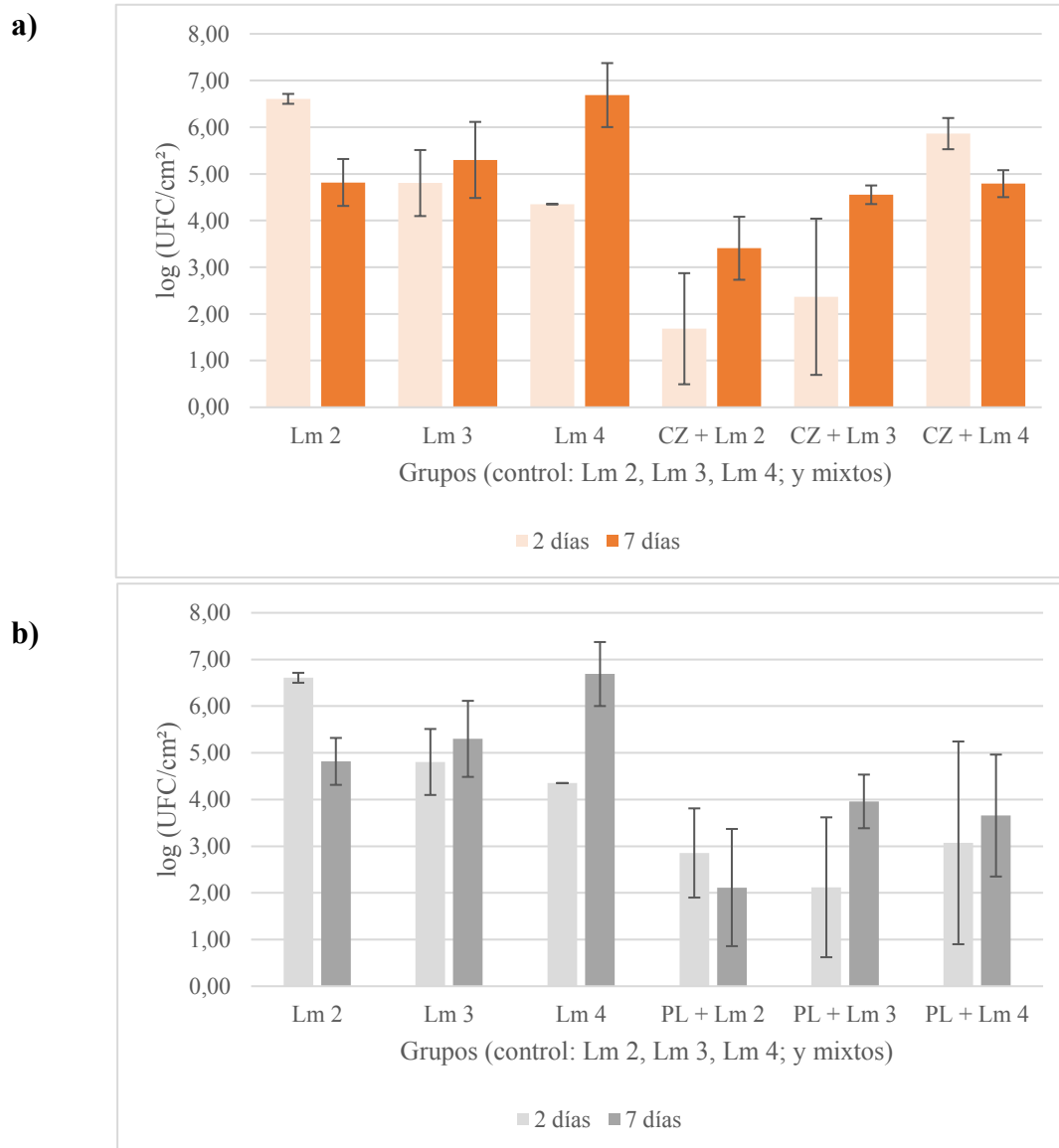
El empleo de microorganismos con la capacidad para producir ciertas sustancias y/o comprometer la supervivencia y el crecimiento de determinados patógenos, impediría, como consecuencia, su supervivencia a largo plazo en instalaciones, puesto que evitaría la generación e implantación completa en biofilm naturales. Esta estrategia diferiría de las que se han desarrollado hasta la actualidad y representaría una alternativa ecológica, interesante y de aplicación potencial en la industria alimentaria.

3.3 Evaluación del efecto de los biofilms preformados de *Pseudomonas* spp. y *Candida zeylanoides* sobre *L. monocytogenes*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento anterior, en el que se evaluó el comportamiento de 22 cepas de *L. monocytogenes* frente a *B* y *R*, no se podía afirmar con seguridad que *B* afectaba a la formación de biofilms de *L. monocytogenes*, ya que podía ser un efecto inducido por el propio diseño experimental. Se debía descartar, entonces, que los recuentos inferiores de *L. monocytogenes* no estuvieran vinculados a: i) las cargas de ambos microorganismos; ii) la presencia de un biofilm preformado de otro microorganismo, lo que implicaría que *B* no ejerce un efecto específico anti-*Listeria*, sino que este patógeno, al no tener una gran capacidad de competencia, no consigue superar esta dificultad ecológica. Por ello, a partir de una planta de procesamiento de salmón, se aislaron múltiples bacterias que formaban parte de la microbiota residente en las instalaciones. Se creó un cóctel de varios aislamientos bacterianos procedentes de cintas transportadoras (*Listeria* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Brochothrix* spp., *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp., *Rhodococcus* spp. y *Chryseobacterium* spp.) para formar biofilms mixtos en discos de acero inoxidable (12°C, con caldo de salmón). Después de 2 días, mostraron que *L. monocytogenes* representaba el 0,1–0,01 % de la población total, en cambio, *Pseudomonas* spp. era mayoritario. Otros autores también observaron que la microbiota inhibió los biofilms de *L. monocytogenes*, pero no los eliminó por completo (Langsrud et al., 2016). Como han mostrado otros autores, al colocar a *L. monocytogenes* en desventaja numérica, en cuanto a carga inicial, esta especie suele mostrar un recuento más bajo sin que las otras especies presentes actúen manifiestamente en su contra (Mellefont et al., 2008).

Para determinar si existió una verdadera competencia entre *B* y *L. monocytogenes*, se repitió el mismo estudio, pero con 3 cepas del patógeno (pertenecientes a los dos serotipos más relacionados con alimentos y listeriosis, 1/2a y 4b) y 3 microorganismos, *C. zeylanoides*, *P. luteola* y *P. fluorescens*, todos aislados de las mismas instalaciones. Tal y como se indicó en el Capítulo IV, sección 3.1, estos microorganismos constituyeron una parte importante de la microbiota presente en superficies de la industria de procesamiento de cerdo ibérico. Se partió de una concentración de $4,00 \times 10^5$ UFC/ml para *C. zeylanoides*; $2,15 \times 10^6$ UFC/ml para *P. luteola*; $1,58 \times 10^8$ UFC/ml para *P. fluorescens* y $1,58 \times 10^7$ UFC/ml de media para *L. monocytogenes*. Estas concentraciones se escogieron siguiendo el criterio de otros autores, que también inocularon en el rango de 10^7 UFC/ml de este patógeno en la formación de biofilms mixtos (Langsrud et al., 2016; Lourenço et al., 2011).

Con estos tres microorganismos, no se observaron diferencias significativas en cuanto a los recuentos de *L. monocytogenes* respecto a sus controles ($P > 0,05$). Además, como se puede ver en la **Figura 26 (a, b, c)**, las tendencias que se observan, a simple vista, fueron distintas a las presentadas con *B* y *R*. En este sentido, *L. monocytogenes* no se vio afectada por la presencia de un biofilm preexistente en la superficie de estas 3 especies probadas. En el caso de *C. zeylanoides* (**Figura 26 - a**), para las cepas Lm 2 y Lm 3, los recuentos disminuyeron a los 2 días y volvieron a aumentar a los 7 días. Sin embargo, para la cepa 4, los recuentos disminuyeron ligeramente a los 7 días, manteniéndose igualmente elevados. En este caso, no parecen existir otros estudios publicados de interacción entre estos dos microorganismos.



c)

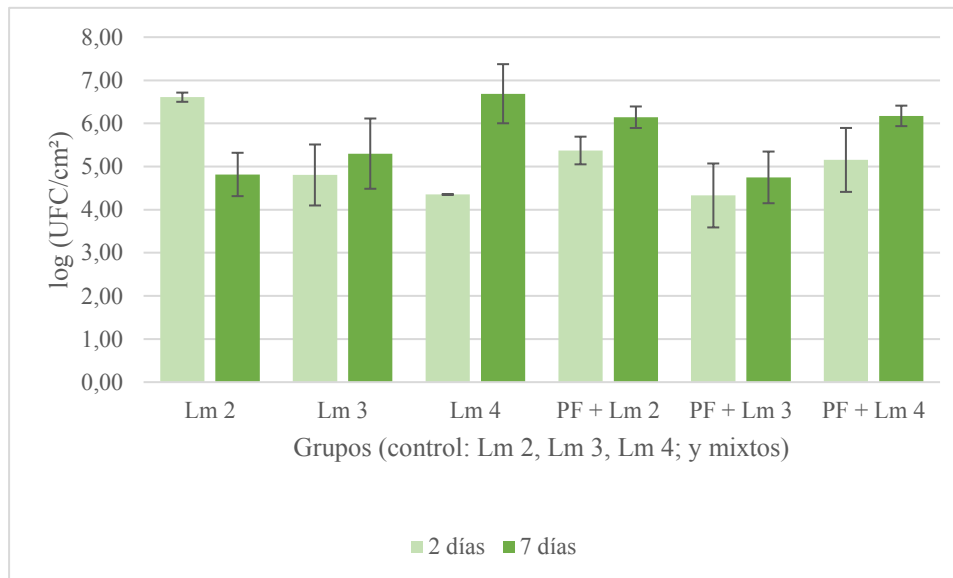


Figura 26. Recuentos de las células que conformaron los biofilms control y mixtos de *Listeria monocytogenes* con: a) *C. zeylanoides*, b) *P. luteola*, c) *P. fluorescens*; tras los 2 y 7 días de incubación. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Con *P. luteola* (**Figura 26 - b**), los recuentos obtenidos de Lm 2 fueron menores respecto al control sin llegar a ser significativos. Para las cepas Lm 3 y Lm 4, los valores fueron inferiores a los 2 días y aumentaron a los 7 días (+ 2 log (UFC/cm²) para Lm 3). En presencia de *P. fluorescens* (**Figura 26 - c**), el total de Lm 2 se redujo levemente, pero su valor remontó a los 7 días alcanzando niveles superiores al propio control. Puga et al. (2016) describieron que, cuando los biofilms alcanzan los 6 días desde su formación, es decir, un cierto estado de madurez, esta etapa no sólo implica dispersión celular, sino que también se observan modificaciones estructurales y multiplicación celular. Este dato podría explicar que volvieran a aumentar los valores de recuento de *L. monocytogenes*. Se observó un comportamiento similar a Lm 2 con Lm 3 y Lm 4, pero manteniendo niveles próximos a los del biofilm monoespecie de *L. monocytogenes*. Puga et al. (2018a) evaluaron también el efecto de biofilms preformados de *P. fluorescens* sobre *L. monocytogenes*. En este caso, demostraron que la población del patógeno fue, de promedio, de 1 a 2 log (UFC/cm²) más alta que cuando este microorganismo crecía en biofilms monoespecie. Parece ser que, *L. monocytogenes*, es capaz de rediseñar la estructura del biofilm de *P. fluorescens* para favorecer su propia proliferación, compactando su estructura. La llegada del patógeno sobre los biofilms de *P. fluorescens* ya establecidos indujo, de hecho, a una sobreproducción de matriz extracelular. Estos mismos autores indicaron, asimismo, que las células de *L. monocytogenes* se acumulaban en las capas inferiores de los biofilms preimplantados,

consiguiendo protección adicional contra las posibles agresiones fisicoquímicas. Una matriz más densa puede contribuir a que los biofilms mixtos sean más resistentes que los monoespecie, contra el ataque externo producido por enzimas, sustancias antimicrobianas u otros agentes (Lourenço et al., 2011). El encogimiento de la matriz podría ser causado por la síntesis de un componente adicional de la matriz extracelular, como resultado de la interacción entre especies, como las fibras amiloides (Puga et al., 2016). Esto podría explicar, en parte, por qué este patógeno puede persistir durante largos periodos en los entornos de las industrias alimentarias (Puga et al., 2018b).

En otro estudio, se evaluó la capacidad competitiva de diferentes cepas de *L. monocytogenes*, junto a bacterias Gram negativas y Gram positivas, por separado, sobre discos de acero inoxidable a 12°C. Los cultivos mixtos incluyeron bacterias residentes de las superficies de industrias cárnicas y de procesado de salmón como *Acinetobacter* spp., *P. fragi*, *P. fluorescens*, *S. liquefaciens* y *S. maltophilia*. En este caso, al cabo de 9 días de incubación, los recuentos más bajos de *L. monocytogenes* fueron hallados a partir del biofilm mixto con bacterias Gram negativas, dominadas por *Pseudomonas* spp. (Heir et al., 2018). Todos estos resultados ponen de manifiesto la existencia de patrones complejos en las interacciones microbianas. De esta forma, la inhibición de *L. monocytogenes* en los cultivos multiespecie, no sólo depende del contacto celular, sino de varios mecanismos involucrados de tolerancia y antagonismo entre especies bacterianas (Heir et al., 2018).

Los resultados del presente experimento demostraron que el efecto observado en el estudio anterior con *B* y *R* no había sido consecuencia del diseño experimental ya que, si fuera así, *L. monocytogenes* habría tenido el mismo comportamiento con todos los microorganismos con los que se enfrentó en estas mismas condiciones. En cambio, se demostró que *L. monocytogenes* no fue afectada por la existencia de los biofilms preformados de *C. zeylanoides*, *P. luteola* y *P. fluorescens*.

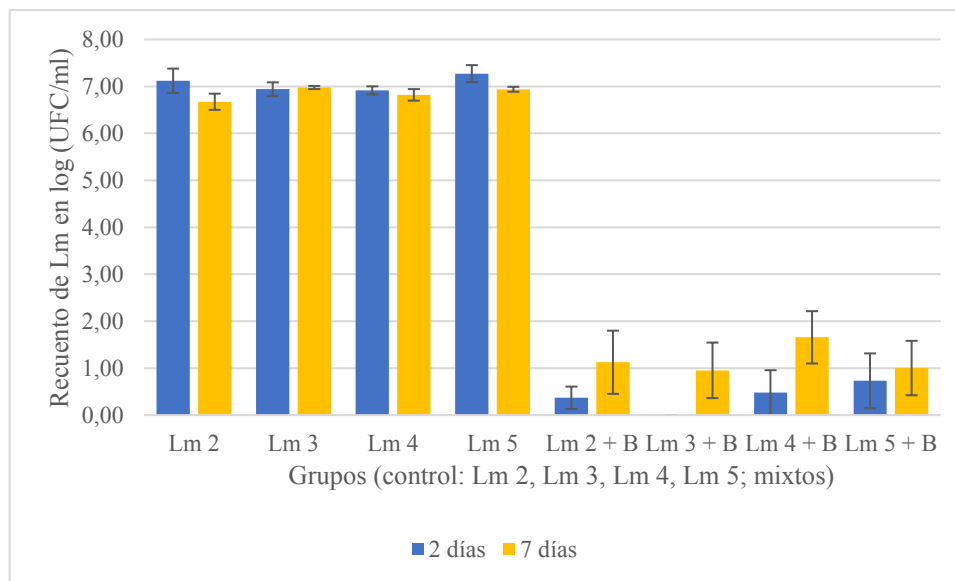
3.4 Caracterización del efecto de los biofilms preformados de *B* y *R* sobre *L. monocytogenes*

Los resultados de la evaluación del efecto de los biofilms preestablecidos de *C. zeylanoides*, *P. luteola* y *P. fluorescens* confirman que *B* y *R* ejerció un impacto negativo sobre la formación de biofilms de *L. monocytogenes*. La siguiente interrogación se enfocó en cómo

B y *R*, aunque fuera en menor medida, afectaron al patógeno. Para contrastar las hipótesis planteadas en la sección 4.2 del presente capítulo, se llevó a cabo el análisis del agua de lavado con el objetivo de caracterizar mejor el efecto de estos biofilms preformados. En realidad, en vista de los resultados obtenidos con *B*, se pensó que el biofilm de este microorganismo no permitía, por algún motivo, que *L. monocytogenes* se estableciera en las superficies. Siendo así, todas las células de *L. monocytogenes* que no se habrían podido adherir a la superficie, habrían sido arrastradas por el agua de lavado.

Los biofilms nuevamente formados para este experimento se generaron a partir de inóculos de $1,04 \times 10^6$ UFC/ml de *B*; $4,25 \times 10^5$ UFC/ml de *R* y $1,03 \times 10^6$ de media de las cepas de *L. monocytogenes*. Los resultados del análisis de las aguas de lavado no confirmaron la hipótesis inicial. La tendencia, mostrada en la **Figura 27 - a y b**, indicó que la carga de *L. monocytogenes* en el agua de lavado de los biofilms mixtos, fue inferior a la carga del agua de lavado de los biofilms control, tanto con *B* como con *R*. En el caso de *B*, todas las cepas mostraron un recuento significativamente inferior ($P < 0,0001$). A los 7 días, tres cepas de las cuatro ensayadas manifestaron diferencias significativas (Lm 2, $P = 0,00$; Lm 3, $P < 0,0001$; Lm 5, $P < 0,0001$). Con *R*, los resultados observados fueron similares ya que, a los 2 días, los recuentos de Lm 3 y Lm 4 fueron significativamente distintos de su control ($P = 0,03$ y $P = 0,00$; respectivamente) y, a los 7 días, las 4 cepas dieron valores de log (UFC/ml) significativamente inferiores (Lm 2, $P = 0,00$; Lm 3 $P < 0,0001$; Lm 4, $P < 0,0001$; Lm 5, $P = 0,00$).

a)



*Para la cepa Lm 3 en la que no se aprecia recuento a los 2 días (B + Lm 3), la media del recuento de *L. monocytogenes* fue de 0 UFC/ml.

b)

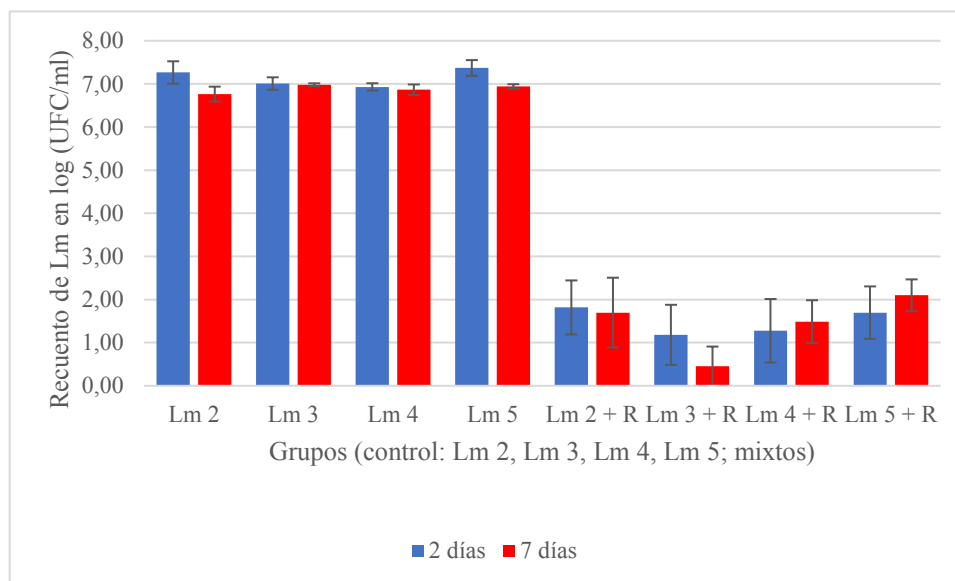


Figura 27. Recuentos de las células que conformaron los biofilms control y mixtos de *Listeria monocytogenes* con: a) B, b) R; tras los 2 y 7 días de incubación. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

La tendencia observada indica que estos microorganismos, y de forma más contundente B, afectan a la viabilidad del patógeno ya que, en 2 días, *L. monocytogenes* no se pudo implantar de forma correcta y tampoco se recuperó en las aguas de lavado. Después, a los 7 días, los recuentos se mantuvieron significativamente más bajos ($P < 0,05$) que lo obtenidos a partir de los biofilms control. Estos resultados indican que los dos microorganismos competidores no sólo compiten por el espacio, sino que afectan a la viabilidad misma del patógeno. Este

hecho revela, de nuevo, las posibilidades a nivel industrial que podrían tener el empleo de microorganismos con este perfil para el reemplazo ecológico, por la capacidad de producir determinadas sustancias que afectan a un patógeno tan importante como es *L. monocytogenes*. No obstante, serían necesarios más estudios para determinar su eficacia en condiciones reales y así poder precisar su empleo como herramienta conjunta en el control de biofilms.

4. Conclusión parcial

Los biofilms maduros preformados de *B* son capaces de inhibir la formación de biofilms de múltiples cepas de *L. monocytogenes*, destruyendo al patógeno, por un mecanismo que aún no ha sido precisado. Se requieren más estudios para conocer el/los mecanismo/s responsables de este efecto, pero se puede adelantar que no sólo se debe a una simple competencia por espacio o nutrientes.

En cuanto a *R*, aunque no favorece la presencia de *L. monocytogenes*, considerando los resultados obtenidos, no se podría utilizar por sí solo como un agente potente para el biocontrol del patógeno. En vista de las propiedades no enterotoxigénicas de *B*, favorecer la presencia de este microorganismo en las industrias cárnicas, podría representar una vía más en la lucha contra la persistencia de *L. monocytogenes*, junto con la acción de otros inhibidores bacterianos y operaciones de higiene apropiadas.

**VII. BIOCONTROL DE *LISTERIA*
MONOCYTOGENES EN SUPERFICIES Y
PRODUCTO FINAL: APROXIMACIÓN AL
ENTORNO INDUSTRIAL**

1. Planteamiento inicial

En vista de los resultados prometedores a nivel *in vitro*, presentados en el capítulo anterior, se planteó la necesidad de realizar más pruebas en un entorno similar al de una industria alimentaria.

Para seguir con el desarrollo de un posible método complementario de control de *L. monocytogenes* en industrias cárnicas, se realizaron dos estudios adicionales:

- i) Evaluación del efecto de biofilms preformados de *B* sobre una cepa no patogénica de *L. monocytogenes* en las superficies de una planta piloto.
- ii) Análisis del efecto de la presencia de *B* en salchichones y chorizos a nivel organoléptico, así como sobre *L. monocytogenes* y otros indicadores microbianos a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración (*challenge test*).

2. Materiales y métodos

2.1 Evaluación del efecto de biofilms preformados de *B* sobre una cepa no patogénica de *L. monocytogenes* en las superficies de una planta piloto

2.1.1 Superficies de estudio

El experimento se planteó en dos materiales distintos: en el suelo de una planta piloto y en placas de acero inoxidable. El suelo consistía en un pavimento industrial continuo de hormigón recubierto con una resina epoxídica, materiales que son habituales en la construcción de suelos para la industria alimentaria. En general, este tipo de pavimento no tiene juntas, es muy resistente a las abrasiones físicas, químicas y es fácil de limpiar. No obstante, el suelo presentaba algunos daños físicos, lo que comprometía su completa integridad e influía en la porosidad. Por otra parte, se utilizaron placas de acero inoxidable AISI 316 con grado 2B de 5 x 5 cm y 1 mm de grosor. Antes de ser empleado, este material fue sometido a procedimientos de limpieza y desinfección estándar, consistentes en la limpieza con un detergente alcalino clorado, aplicado a temperatura ambiente y desinfección posterior con un desinfectante basado en amonio cuaternario. Las placas de acero inoxidable se limpiaron, primero, con un detergente no bactericida (ADIS Higiene, Madrid, España), después, se desinfectaron con isopropanol al 70 % (Panreac Química, Castellar del Vallès, España) y se dejaron secar en una cabina de flujo laminar (PV-30/70, Telstar, Terrasa, España). Todo ello, se realizó de acuerdo con la norma europea UNE-EN 13697:2015 relativa a materiales no porosos (AENOR, 2015). Para garantizar la esterilidad de las placas de acero inoxidable, se autoclavarón durante 15 minutos a 121°C, antes de ser empleadas para el estudio.

2.1.2 Preparación del inóculo

Las cepas liofilizadas fueron rehidratadas en 9 ml de TSB e incubadas a 30°C durante 40-48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron por el método de estría en superficie en TSA y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. A partir del cultivo, se sembraron colonias aisladas en tubos inclinados de TSA. Éstos se incubaron a 37°C durante 24 horas y se almacenaron a una temperatura de 4°C. Los microorganismos se reactivaron mediante siembra por agotamiento en placas de TSA, y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. A partir de estos cultivos, se prepararon los inóculos bacterianos para formar los biofilms. El inóculo se preparó transfiriendo múltiples colonias aisladas en tubos

de TSB, hasta alcanzar una turbidez de 1,5 unidades McFarland. Seguidamente se realizaron las diluciones correspondientes en tubos de TSB, para obtener una concentración equivalente a aproximadamente 10^2 UFC/ml de *B*. La cepa de *L. monocytogenes* empleada fue *Listeria monocytogenes* CECT 4031 de la Colección Española de Cultivos Tipo, no patogénica, ya que fue un requisito para poder desarrollar el experimental en la planta piloto. Para este caso se inoculó, en el momento requerido, 1 ml de la suspensión bacteriana preparada, que contenía aproximadamente 10^2 UFC/ml del patógeno.

2.1.3 Formación de biofilms en la planta piloto

El estudio se llevó a cabo en una pequeña sala de la planta piloto mencionada, previamente limpiada y desinfectada, como se ha descrito previamente, y a continuación con un producto de limpieza industrial a base de una mezcla enzimática (15 minutos) y dióxido de cloro (10 minutos). La temperatura ambiente media fue de 11,5°C durante el transcurso de tiempo en el que se efectuó la prueba. Las áreas del suelo estudiadas y las placas de acero inoxidable se encontraban en la misma sala. Todos los biofilms formados se mantuvieron bajo estas condiciones durante 72 horas.

Para la formación de biofilms de *B* en el suelo, se marcaron áreas de estudio de 225 cm² con cinta adhesiva. Éstas, a su vez, contenían en su interior, tres áreas cuadradas de 25 cm² marcadas también con la cinta adhesiva. Se delimitaron así cuatro áreas para formar los biofilms control de *L. monocytogenes*, *B*, dos grupos mixtos B1 + Lm y B2 + Lm, y dos áreas de 225 cm² en total, como control para evaluar la microbiota presente (**Figura 28**). Se tomaron dos esponjas (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) para valorar la microbiota residente, después del procedimiento de limpieza y desinfección (al inicio de la prueba). En este sentido, se instaló también, meses atrás, un sensor SCH para verificar que, en el momento del estudio, el proceso de limpieza y desinfección hubiera sido debidamente realizado. Los dos grupos mixtos se diferenciaban en los tiempos de inoculación de *L. monocytogenes*, siendo ésta inoculada a las 24 horas de la formación del biofilm de *B* para el grupo B1 + Lm y a las 48 horas para B2 + Lm. Para poder realizar el ensayo, se inoculó 1 ml de la suspensión bacteriana de *B* previamente preparada en cada área. El mantenimiento de los biofilms en el suelo se llevó a cabo únicamente con la renovación de nutrientes.

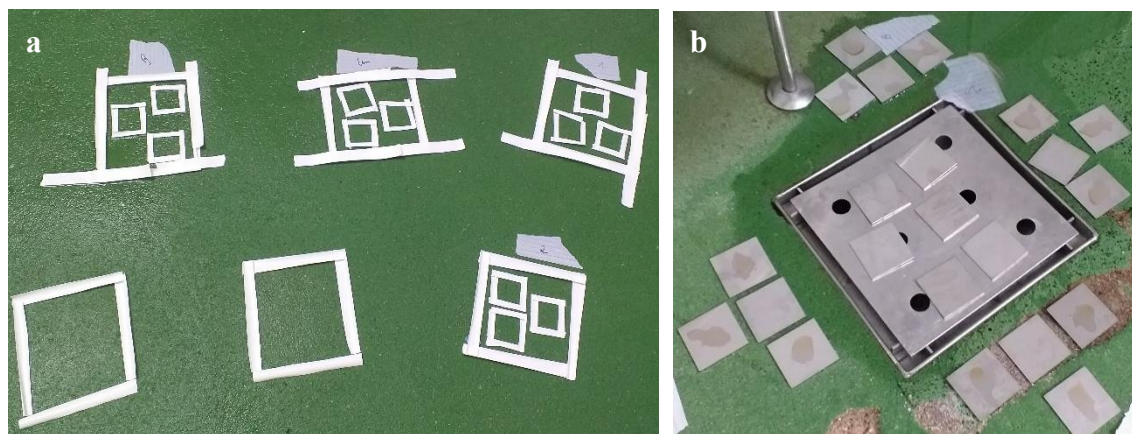


Figura 28. Fotografías del experimento en las que se observan las áreas de estudio: a) marcadas en el propio suelo de las instalaciones; y b) las placas de acero inoxidable, posicionadas a proximidad de un sumidero.

En cuanto a las placas de acero inoxidable, se dispusieron tres placas, formando tres réplicas por cada grupo experimental, encima del suelo y alrededor de un sumidero de la sala (**Tabla 17**). Además, se añadió una placa estéril por cada grupo para valorar la posible transferencia de microorganismos por contaminación cruzada. Se dispusieron, también, 6 placas en el sumidero para evaluar la capacidad de transferencia de *L. monocytogenes* al realizar los lavados. Una vez colocadas las diferentes placas, se inoculó 1 ml de la suspensión bacteriana preparada de *B* en el centro de cada placa. En este caso, el mantenimiento de los biofilms en las superficies se efectuó con lavados y renovación de nutrientes. Este proceso se realizó cada 24 horas para los controles de *B* y para los grupos B1 + Lm y B2 + Lm y, después, para los controles de *L. monocytogenes*. Asimismo, se lavaron las placas, con 25 ml de agua destilada estéril por duplicado, y aportando 1 ml de TSB estéril en los mismos.

Tabla 17. Codificación de los grupos experimentales del estudio en la planta piloto.

Grupos experimentales	Descripción
Lm	Grupo control de <i>L. monocytogenes</i>
B	Grupo control de <i>B</i>
B1 + Lm	Grupo con biofilm preformado de 24 horas de <i>B</i> e integración de <i>L. monocytogenes</i> al cabo de las 24 horas
B2 + Lm	Grupo con biofilm preformado de 48 horas de <i>B</i> e integración de <i>L. monocytogenes</i> al cabo de las 48 horas

2.1.4 Cuantificación de biofilms mediante cultivo tradicional y sistema TEMPO

Al acabar el experimento, se lavaron y retiraron las 22 placas de acero inoxidable para ser analizadas en el laboratorio. En cuanto a las áreas marcadas en el propio suelo de la sala, se emplearon 22 esponjas para muestrear todas las zonas bajo estudio, para ser procesadas a su vez en el laboratorio. La sala de estudio fue limpiada con un producto enzimático (EnzyJet, iTram Higiene, Vic, España) y desinfectada con un agente clorado, para garantizar la eliminación completa de la cepa empleada de *L. monocytogenes*.

Cada placa se colocó en un frasco estéril que contenía 8,5 g de perlas de vidrio estériles y 9 ml de agua de peptona. Una vez introducidas las muestras en los frascos, éstos se agitaron con vórtex durante 1,30 minutos a 40 Hz. Las 22 esponjas fueron agitadas mediante Stomacher (BagMixer, Interscience, Saint Nom, Francia) durante 90 segundos, para desprender todos los microorganismos recogidos por la esponja. Cada suspensión resultante fue diluida decimalmente en tubos de agua de peptona de 9 ml. Se sembraron, por diseminación en superficie, con un asa de Digiralsky estéril, 1 ml de la dilución correspondiente en placas de ALOA, agar Sabouraud, agar MRS y agar PCA modificado. Esta modificación consistió en la inclusión de un indicador de color para hacer visibles los cambios de pH (0,03 g de rojo fenol por litro de medio preparado). Por otra parte, se transfirió 1 ml de la muestra a un vial previamente hidratado con 3 ml de agua destilada estéril, para obtener el recuento total con el sistema TEMPO. El vial se agitó en vórtex, para homogeneizar su contenido, y se transfirió, a través de la unidad de llenado TEMPO, a la tarjeta para su posterior incubación. Las placas de ALOA y de PCA modificado se incubaron a 37°C durante 24 horas, las tarjetas TEMPO y las placas de MRS, a 30°C durante 48 horas y, finalmente, las placas de Sabouraud a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente, se obtuvieron los recuentos y se realizaron los ajustes necesarios para expresar los resultados en log (UFC/cm²).

2.2 Análisis del efecto de la presencia de *B* en salchichones y chorizos a nivel organoléptico, y sobre *L. monocytogenes* y otros indicadores microbianos (*challenge test*)

2.2.1 Planteamiento del *challenge test*

Se planteó evaluar el efecto de *B* en dos productos acabados de la industria cárnica bajo estudio. En efecto, para poder seguir con el desarrollo de esta estrategia de biocontrol de *L. monocytogenes*, se debía comprobar que este microorganismo, presente en cargas muy superiores a las habituales, no era capaz de afectar la calidad organoléptica de los productos finales. Este *challenge test* fue llevado a cabo durante un periodo de 90 días realizando análisis de las muestras a los tiempos 0, 7, 14, 28, 45 y 90 días. Se buscó, por una parte, evaluar su capacidad alterante en salchichones y chorizos no loncheados envasados al vacío y almacenados, tanto a temperatura de refrigeración como ambiente, y, por otra parte, su potencial anti-*Listeria* dentro de productos finales contaminados. *B*, al ser aerobio estricto, no parecía ser un candidato idóneo para controlar a *L. monocytogenes* por competencia, pero si el responsable de su acción antimicrobiana fueran componentes celulares o de su metabolismo enzimático, se debería ver actividad en este estudio. Se emplearon muestras de 25 g de producto, tanto de salchichón como chorizo. Se colocaron en bolsas estériles y se sellaron al vacío para su almacenamiento a la temperatura correspondiente (**Tabla 18**).

Tabla 18. Codificación de los grupos experimentales definidos en el *challenge test*.

Grupos experimentales	Descripción
A	Grupo de muestras inoculadas con <i>Lm</i> y <i>B</i> y mantenidas a una temperatura de almacenamiento de 4°C.
B	Grupo de muestras inoculadas con <i>Lm</i> y <i>B</i> y mantenidas a temperatura ambiente (15-20°C).
C	Grupo control inoculado con <i>Lm</i> , mantenido a 4°C.
D	Grupo control inoculado con <i>Lm</i> , mantenido a temperatura ambiente.
E	Grupo control inoculado con <i>B</i> , mantenido a 4°C.
F	Grupo control inoculado con <i>B</i> , mantenido a temperatura ambiente.
Producto control	Muestras de producto intactas mantenidas tanto a temperatura ambiente como de refrigeración.

2.2.2 Preparación de los inóculos

Como se ha indicado en la sección 2.1.2 del presente capítulo, se prepararon los inóculos bacterianos para iniciar el *challenge test*. La concentración inicial del inóculo preparado se determinó mediante el sistema TEMPO para *B* y cultivo en placas de ALOA para *L. monocytogenes*. Con ese fin, se realizó un nuevo cultivo de *L. monocytogenes* a partir de las cepas stock, mantenidas en tubos inclinados, mediante siembra por agotamiento en placas de TSA. Estas placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Se estimó la concentración microbiana inicial con el densitómetro DENSIMAT. El inóculo se preparó transfiriendo múltiples colonias aisladas en TSB, hasta que se obtuvo una turbidez de 0,1 unidades McFarland, equivalente a aproximadamente 10^7 UFC/ml.

En los grupos A y B, se inocularon 125 µl de una suspensión de *B* a 10^8 UFC/ml, preparada en tubos de agua destilada estéril, repartiéndose en 5 áreas dentro de la muestra de 25 g de producto (**Figura 29**) y se añadieron, seguidamente, 125 µl de 10^8 UFC/g de un cóctel de 4 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la planta colaboradora (Lm 2, 3, 4, 5). Se realizó entonces un inóculo final de 250 µl con *B* y *L. monocytogenes*, estando cada uno de los microorganismos al 50 % dentro de este volumen final. Este volumen de inoculación, así como otras condiciones experimentales, se establecieron según los criterios propuestos por el NACMCF (Comité de Asesoramiento Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos) donde se exponen diferentes parámetros y protocolos de estudio a tener en consideración para la realización de *challenge tests* (NACMCF, 2010). En este sentido, por ejemplo, no se recomienda que los inóculos sean superiores a un 1 % del peso final de la muestra. En los grupos C y D, se inocularon 125 µl del cóctel del patógeno. Para los grupos E y F, se inocularon 125 µl de *B*.



Figura 29. Muestra de chorizo del grupo experimental A, inoculada en 5 áreas.

2.2.3 Cuantificación de *L. monocytogenes* y otros indicadores microbianos

Las muestras de producto fueron trasladadas a bolsas de Stomacher estériles con filtro lateral (Sudelab, Barcelona, España) y se añadió, por cada muestra, una botella de 225 ml de agua de peptona tamponada (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Se agitaron por Stomacher durante 90 segundos. Las suspensiones resultantes fueron diluidas decimalmente en tubos de agua de peptona de 9 ml. Se sembraron, por diseminación en superficie con un asa de Digralsky estéril, 1 ml de las diluciones correspondientes en placas de ALOA, MRS, Sabouraud y PCA modificado. Por otra parte, se transfirió 1 ml de la muestra a un vial previamente hidratado con 3 ml de agua destilada estéril, para obtener el recuento total con el sistema TEMPO. El vial se agitó en vórtex, para homogeneizar su contenido, y se transfirió, a través de la unidad de llenado TEMPO, a la tarjeta para su posterior incubación. Las placas de ALOA y PCA fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, las placas de MRS y las tarjetas TEMPO, a 30°C durante 48 horas, y finalmente, las placas de Sabouraud a temperatura ambiente durante 5 días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se obtuvieron los recuentos y se realizaron los ajustes necesarios para expresar los resultados en log (UFC/g).

2.3 Análisis estadístico

Para empezar, se realizó un análisis exploratorio de los datos y se efectuó la prueba de *Shapiro-Wilk* para contrastar la normalidad de los conjuntos de datos (recuentos por cada microorganismo y tiempo), mediante el paquete de software estadístico SPSS Statistics IBM 23. Los recuentos bacterianos obtenidos se convirtieron en valores logarítmicos decimales para reducir la variabilidad de los ensayos microbiológicos. Para analizar los resultados de cada experimento, se recurrió al software estadístico GraphPad Prism. Como todos los conjuntos de datos eran compatibles con una distribución normal ($P > 0,05$), se ejecutó una prueba ANOVA de dos vías para evaluar, por cada tiempo de análisis y por cada grupo experimental, las diferencias en el recuento de *L. monocytogenes*, aerobios totales, bacterias del ácido láctico y levaduras, tanto en el experimento de la planta piloto, como en el *challenge test*. Se empleó un nivel de significación de 5,0 %, para el análisis de todos los datos y se realizó un contraste *a posteriori* mediante la prueba de Tukey.

3. Resultados y discusión

3.1 Efecto de los biofilms preformados de *B* sobre *L. monocytogenes*, no patogénica, en superficies de una planta piloto

3.1.1 Método de muestreo

Los resultados obtenidos de los controles de *L. monocytogenes*, inoculada en el suelo de la planta piloto, fueron sorprendentes, puesto que los valores fueron 0 UFC/cm² a partir de las placas de agar ALOA. Se debe tener en consideración que una muestra negativa no garantiza la ausencia de microorganismos, sino que pueden ser falsos negativos (Ismaïl et al., 2013). Los resultados obtenidos fueron completamente inesperados, ya que la metodología de toma de muestra que se utilizó es altamente empleada en estudios de campo, donde se evalúa la microbiota presente en superficies de la industria alimentaria (Dzieciol et al., 2016; Muhterem-Uyar et al., 2015; Schön et al., 2016). En efecto, en un estudio a largo plazo, que tuvo por objetivo la validación de un sistema de detección para *Listeria* spp. en diferentes ambientes, como comercios minoristas o plantas de procesamiento de carne, leche y marisco, se consideró esta metodología como la más adecuada para la recogida de muestras (Fortes et al., 2013). En este sentido, los procedimientos de frotis (con hisopados y/o esponjas) son considerados como las técnicas más apropiadas para superficies difíciles de limpiar o irregulares, más que los laminocultivos (Ismaïl et al., 2013). En el presente estudio, el material del suelo era rugoso, por ello, las esponjas se consideraron como el método de muestreo más adecuado. No obstante, esta técnica parece ostentar varias limitaciones ya que, por ejemplo, no permiten evaluar capas internas en las que se encuentran los microorganismos debido a la porosidad específica de algunas superficies (Ismaïl et al., 2013). Esto es importante de cara al control rutinario de las superficies, puesto que, si el material está afectado, con un desgaste superficial que permita la existencia de poros en superficie, implica el paso de los microorganismos a capas más profundas del suelo. La consecuencia de ello es la contaminación profunda de la instalación, con controles analíticos negativos. Por ello, el primer paso para un buen control higiénico será la verificación de un buen estado de los materiales.

Para poder dar explicación a los resultados obtenidos es importante resaltar la importancia que tiene la humedad. De acuerdo con esto, Moore y Griffith (2002) compararon diferentes métodos de muestreo: hisopos, laminocultivos y esponjas. Determinaron, en su estudio, que las esponjas habían sido el método de recogida de muestras menos efectivo, con peores

resultados en comparación con el resto, cuando se habían secado las superficies. En la planta piloto, se realizaron las inoculaciones después del proceso de lavado y desinfección sobre superficies húmedas. No obstante, transcurridas 24 horas, se observó que el suelo se había secado completamente, excepto el área del sumidero que se mantuvo más húmeda. Los métodos de muestreo de frotis (hisopos, esponjas) son eficientes, pero presentan limitaciones ya que existe una escasa reproducibilidad entre operadores por las diferentes presiones aplicadas en la superficie (Ismaïl et al., 2013). Este factor de variabilidad se tuvo en consideración cuando se realizó el experimento ya que una misma persona se encargó de tomar las muestras entre los diferentes grupos experimentales del suelo. Estos métodos permiten recoger sólo una pequeña proporción de la población bacteriana total presente en la superficie y, especialmente, si ésta se seca (Carpentier, 1997; Moore y Griffith, 2002).

Por otra parte, los microorganismos pueden quedar, además, atrapados en la punta del hisopo o en la esponja. Por ello, la etapa de recuperación y desprendimiento de aquellos microorganismos muestreados en la superficie es completamente crucial. En este estudio, las esponjas se introdujeron en el equipo Stomacher durante 90 segundos para limitar este inconveniente. Por último, algunos autores consideran que la recuperación de microorganismos parece estar más relacionada con la textura de la superficie que con la porosidad (Ismaïl et al., 2013).

En cuanto a las placas de acero inoxidable, la metodología empleada se considera correcta ya que se pudo recuperar los biofilms formados sobre este material. La agitación con perlas de vidrio o por sonicación permite desprender los microorganismos adheridos a la superficie (Fijan y Šostar-Turk, 2010; Gerba y Kennedy, 2007; Traoré et al., 2002). La agitación vigorosa con perlas de vidrio hace que los microorganismos se liberen completamente de la superficie, incluso si forman biofilms, ya que las fuerzas de fricción generadas son muy elevadas (Lindsay y von Holy, 1997).

3.1.2 Condiciones ambientales y otros factores

A pesar de que se intentó reproducir a mayor escala la prueba realizada *in vitro* (ver Capítulo VI), las condiciones ambientales del estudio llevado a cabo en la planta piloto fueron claramente diferentes. Para empezar, los tiempos fueron mucho más cortos (72 horas en vez de 1 semana) y la temperatura ambiental mucho más baja (11,5°C en vez de 30°C). En vista

de los resultados obtenidos, se podría considerar que 48 horas es el mínimo tiempo requerido para la formación de un biofilm de *B*. En las pruebas *in vitro* realizadas en etapas anteriores de la investigación (ver Capítulo VI), también se mantuvo el biofilm intacto durante 48 horas, antes de valorar algún efecto por parte de *B*. Azizbekyan et al. (2015) observaron, asimismo, la formación de biofilms de *B. laterosporus* al cabo de 48 horas a 30°C. La temperatura podría haber sido, también, un factor determinante en el desarrollo de una estructura compleja ya que varias especies de este género presentan una temperatura óptima elevada, 28°C para *Brevibacillus agri* y *Brevibacillus centrosporus*, de entre 15°C a 35°C para *Brevibacillus invocatus* y de entre 30°C a 35°C para *Brevibacillus limnophilus* (Panda et al., 2014). Existen evidencias sólidas sobre el impacto que ejerce la temperatura en la producción de proteínas por parte de los microorganismos, con un aumento comprobado en la tasa de crecimiento a temperaturas superiores a 30°C para *Bacillus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp. y *E. coli*. Por ejemplo, un cambio de temperatura brusco puede afectar a la expresión proteica de *Bacillus* spp. A partir de esta investigación, aunque la resiliencia puede incrementarse en generaciones futuras, los cambios drásticos de temperatura perturban el desempeño óptimo de microorganismos mesofílicos (Ndlela et al., 2018). Sadiq et al. (2017) determinaron, incluso, que *B* no era formador de biofilms a 37°C, lo que confirma que las condiciones ambientales pueden influir drásticamente sobre la formación de biofilms y sobre los resultados obtenidos.

Otra modificación notable, respecto a la prueba realizada *in vitro*, fue la cepa empleada de *L. monocytogenes*. Esta última, no patógena, no había sido utilizada en etapas anteriores de la investigación y por consiguiente se desconocía el grado y capacidad de formación de biofilms. Es importante destacar que se han observado diferencias significativas en cuanto a la formación de biofilms entre cepas de *L. monocytogenes* (Borucki et al., 2003; Doijad et al., 2015; Heir et al., 2018).

3.1.3 Biocontrol de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies

En el presente estudio, llevado a cabo sobre placas de acero inoxidable, no se detectó ningún efecto por parte de *B*. Globalmente, los recuentos de *L. monocytogenes* fueron bajos ($2,2 \times 10^2$ UFC/cm²) y no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos, tanto en el recuento del patógeno, como de aerobios totales y de levaduras (**Figura 30 - a, b, c**). Se aprecia una ligera tendencia en la que *L. monocytogenes* presenta una carga menor en el

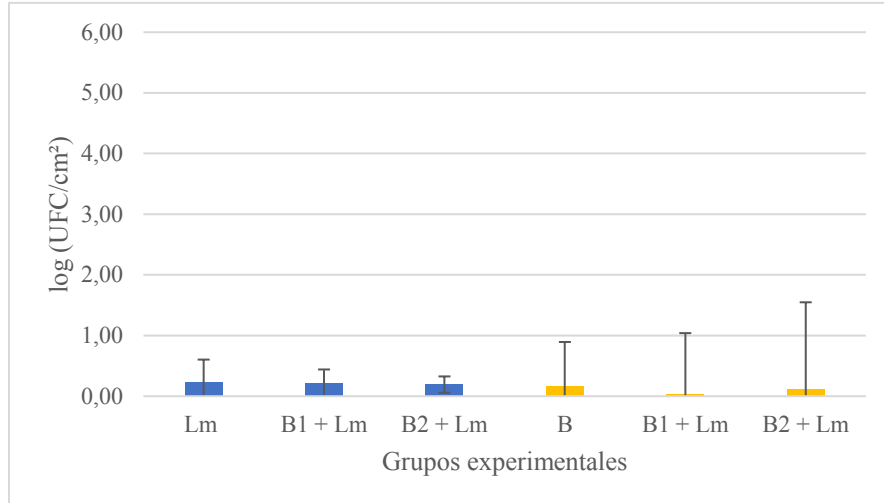
grupo B2 + Lm respecto a su control y a B1 + Lm, coincidiendo con un aumento de *B*. Estos resultados nos indican que la acción de *B* es dependiente de la cantidad de células presentes y de su estado. Los niveles de contaminación en superficie fueron muy bajas, en el límite de detección. Esta misma situación se produjo en las dos bacterias introducidas en el estudio. Como se ha comentado, el tiempo de trabajo fue de 48 horas, mientras que, en el laboratorio, los tiempos de generación de biofilm fueron de 7 días. Se hace necesario, por tanto, incrementar los tiempos de trabajo, para asegurar un desarrollo idóneo de los biofilms, así como asegurar las condiciones que permitan el crecimiento de *B* en las instalaciones. Sin embargo, los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales se situaron alrededor de los 5 log (UFC/cm²). Estos microorganismos son propios de la planta piloto, y fueron capaces de contaminar las placas, adherirse y colonizar las superficies en 48 horas. Por tanto, la colonización de un nuevo microorganismo en un entorno industrial va a requerir entender las condiciones ecológicas que aseguren su implantación. Para ello, se hará necesario establecer los nutrientes precisos y el tiempo mínimo para romper el equilibrio previo en la instalación.

No se detectaron bacterias del ácido láctico en ninguna de las placas bajo estudio. Las especies que actualmente se incluyen en el género *Brevibacillus* spp. han sido objeto de múltiples estudios ya que representan una fuente rica de péptidos antimicrobianos, como la gramicidina (Desjardine et al., 2007; Ghadbane et al., 2013; Panda et al., 2014; Song et al., 2012; Yang et al., 2016; Yang y Yousef, 2018). La brevibacilina, otro lipopéptido activo contra bacterias Gram positivas, fue descubierto recientemente a partir de *B. laterosporus* (Yang y Yousef, 2018). Esta molécula mostró una actividad antimicrobiana comparable a la vancomicina contra un panel de bacterias Gram positivas patógenas y alterantes, como *L. monocytogenes*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *S. aureus*. Parece ser que la brevibacilina es capaz de unirse al ácido lipoteicoico de la pared celular de *S. aureus* y ejercer la permeabilización de la membrana citoplásmica. El genoma de la cepa productora fue además secuenciado, identificando el grupo de genes responsables de la síntesis de brevibacilina (Yang et al., 2016).

Durante los últimos años, se ha prestado gran atención a las bacterias del ácido láctico en la inhibición de determinadas especies de microorganismos (Aguilar et al., 2011; Asurmendi et al., 2015; Baka et al., 2014; Castellano et al., 2017; Chacon et al., 2015; Dortu et al., 2008; O'shea et al., 2013). Este interés nace debido al uso excesivo de sustancias antimicrobianas

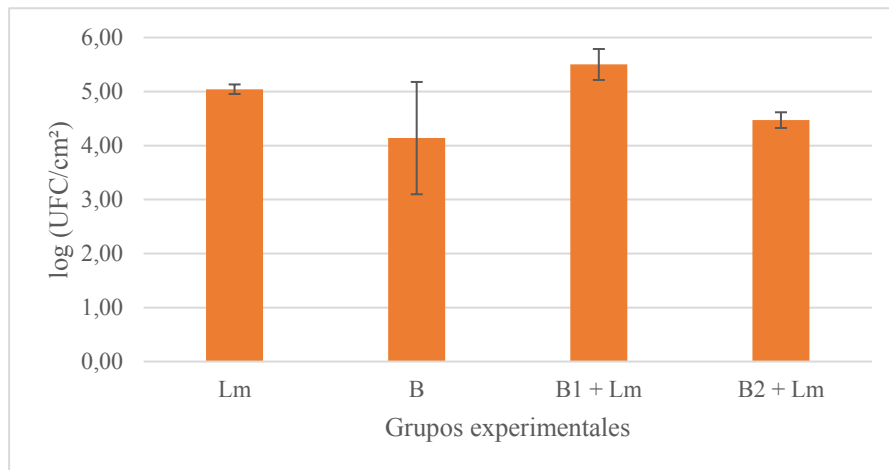
que ha dado lugar a la aparición de resistencias. Se han estudiado mayoritariamente las BAL, consideradas, generalmente, como inocuas. Estas bacterias pueden secretar varias sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que pueden competir con patógenos (Oloketuyi y Khan, 2017). Algunas bacterias actúan como antimicrobianos, antiadherentes y antibiofilms. En este sentido, se ha demostrado, por ejemplo, que las bacteriocinas producidas por *L. plantarum*, *L. lactis* y *Enterococcus casseliflavus* pueden controlar biofilms formados por *L. monocytogenes* (Oloketuyi y Khan, 2017). La bacteriocina producida por *Leuconostoc* spp. fue también capaz de retrasar la formación de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable. La actividad anti-*Listeria* de *L. plantarum* parece estar asociada a la producción de ácidos orgánicos y de sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas. La sonorensina, una bacteriocina, posee asimismo actividad inhibidora contra biofilms formados por *L. monocytogenes* en superficies de polietileno de baja densidad (Oloketuyi y Khan, 2017). La bacteriocina producida por *Carnobacterium piscicola* también inhibe la formación de biofilms de *L. monocytogenes* (Nilsson et al., 2005). Sin embargo, en nuestro estudio, las bacterias lácticas no están jugando un papel relevante en la microbiota de la instalación.

a)



Las barras de color azul corresponden al recuento de *L. monocytogenes* en ALOA y las barras de color amarillo indican el recuento de *B* en PCA modificado, en los diferentes grupos experimentales.

b)



c)

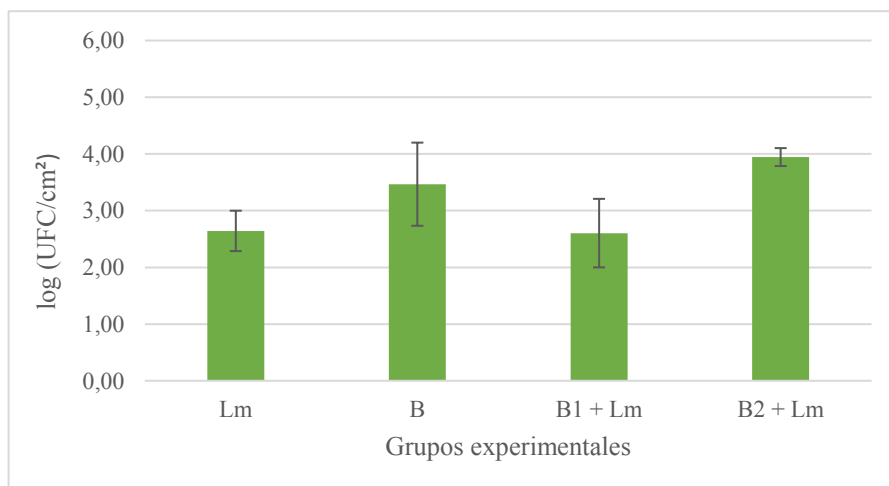


Figura 30. Recuento en log (UFC/cm²) de a) *Listeria monocytogenes* y *B*; b) aerobios totales; y c) levaduras en los diferentes grupos experimentales. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 3).

En otro estudio, se evaluó la capacidad de supervivencia de *L. monocytogenes* en un biofilm bimespecie con la cepa *L. lactis* CNRZ 150, productora de bacteriocina (Leriche et al., 1999). Se simularon dos situaciones: i) se depositó *L. monocytogenes* en un biofilm de un día de *L. lactis* (adherencia diferida); ii) *L. monocytogenes* fue mezclada simultáneamente con *L. lactis* (adherencia simultánea) para formar los biofilms. Se realizaron recuentos de *L. monocytogenes* durante 48 horas. La sustitución del medio de cultivo fue efectuada a las 20-24 horas desde la formación de los biofilms. Los resultados de este trabajo mostraron que la actividad anti-*Listeria* de *L. lactis* comenzó dentro de las primeras seis horas de la incorporación de *L. monocytogenes* al biofilm. La tasa de reducción de *L. monocytogenes* en el biofilm mixto dependió, en gran medida, de la carga del inóculo: cuando se utilizó el inóculo más bajo para colonizar los discos de acero inoxidable (10^6 - 10^7 UFC/ml), la reducción fue mayor y no se detectó *L. monocytogenes* después de 10 horas (adherencia simultánea) y a las 24 horas (adherencia diferida) en la población adherente, así como en la población planctónica. La adhesión diferida parece ser, en este caso, favorable a *L. monocytogenes* ya que se mantiene durante más tiempo. Con una mayor aportación de *L. monocytogenes* (10^8 UFC/ml), la disminución de los recuentos del patógeno fue relativamente más lenta y fue seguida por una estabilización de la población, lo que llevó al establecimiento de un gran número de células residentes en el biofilm (10^5 a 10^6 UFC/cm²). Este nivel de población se mantuvo durante las 48 horas de experimentación y el reemplazo de los medios de cultivo con medio fresco a las 22 horas (adhesión simultánea) o a las 24 horas (adhesión diferida) no modificó el nivel de la población. Una vez más, el diseño experimental puede ser determinante e influir notablemente en los resultados obtenidos (Leriche et al., 1999). Los resultados de estos estudios no son comparables con el nuestro, puesto que estos autores añadían medio de cultivo y nuevo inóculo, cosa que no ocurre en condiciones reales de trabajo. La presencia de *L. monocytogenes* es ocasional, hasta la formación de biofilms, como formas de resistencia. Por tanto, unas correctas medidas preventivas han de generar unas condiciones de competencia inasumibles por el patógeno. Esto garantizaría la seguridad de la instalación, al existir una microbiota resistente, que no permitiese la implantación del patógeno.

En el presente estudio, el diseño se estableció en base a conocer el efecto ejercido por la adherencia diferida de *L. monocytogenes* sobre un biofilm preformado de *B* en condiciones industriales reales. La tendencia indicó que un mayor tiempo de establecimiento de *B* a las superficies parecía tener un mayor impacto en la reducción de los recuentos de *L.*

monocytogenes. No obstante, la comparación entre los diferentes grupos experimentales no demostró tener diferencias significativas ($P > 0,05$), por lo que los resultados tan solo indicarían una posible tendencia. En realidad, el problema fue que no hubo tiempo suficiente para la construcción de un biofilm de suficiente calidad por parte de *B*. Si en estas condiciones, con una estructura insuficiente, y un bajo número de este microorganismo, se detecta una tendencia de inhibición, podría ser esperable un efecto evidente, cuando se pueda incrementar el tiempo de trabajo en la instalación, hasta conseguir un biofilm completo. En este sentido, se deberían incrementar las repeticiones y trabajar sobre la base de biofilms de *B* a los que se les inoculen bajas cargas de *L. monocytogenes*. Esta situación simularía situaciones reales, especialmente con seguimientos más prolongados y en puntos en los que se detecte la presencia del patógeno.

Zhao et al. (2006) determinaron que *L. lactis* ssp. *lactis* y *E. durans*, obtenidos de suelos de sumideros, tenían capacidad bactericida e inhibían el crecimiento *in vitro* de *L. monocytogenes* en biofilms de 4°C a 37°C por competencia entre las especies. Realizaron también, como aproximación al entrono real, una prueba en una planta de procesamiento de carne de pollo. La aplicación de las dos especies redujo el número de *L. monocytogenes* en sumideros de 3°C a 26°C.

Los parámetros analíticos seleccionados incluyeron el recuento de microorganismos aerobios totales, así como levaduras. En todos los grupos experimentales se obtuvieron recuentos superiores a los microorganismos inoculados, sin una correlación clara, en ambos grupos microbianos, en comparación con aquellos que se inocularon. Estos resultados pueden dar explicación, a su vez, a la diferencia entre aquello demostrado a nivel *in vitro* con lo encontrado a nivel industrial. Al no tener un ambiente completamente controlado a nivel microbiológico y existir un equilibrio previo en la instalación, se produjo una recontaminación con los microorganismos adaptados a la planta. Esto habría limitado la implantación de *B* en un periodo de tiempo tan breve. Por ello, no se habrían puesto de manifiesto las propiedades anti-*Listeria* mostradas a escala de laboratorio. Es por lo tanto importante que se incremente el tiempo de trabajo, incluyendo nutrientes específicos que faciliten la implantación de esta bacteria y que pueda crearse una estructura suficientemente robusta.

Existen otras herramientas para el control de patógenos en superficies como el pre-acondicionamiento con biotensioactivos, para disminuir la adhesión de patógenos a las

superficies. El surfactín, un tipo de biotensioactivo producido por *B. subtilis*, puede modificar la hidrofobicidad de superficies causando una reducción significativa de la adhesión de *L. monocytogenes* al acero inoxidable y al propileno (Oloketuyi y Khan, 2017). La acción de biotensioactivos como agentes anti-biofilms depende de varios factores como el sustrato, el microorganismo formador de la estructura, la concentración y el tipo de surfactante, la temperatura y, finalmente, del tiempo de contacto (Oloketuyi y Khan, 2017). Todo ello puede influir en las condiciones experimentales y, por consiguiente, podría haber variabilidad entre diferentes estudios.

En otro trabajo, Papaioannou et al. (2018) evaluaron el comportamiento de un cóctel de seis cepas de *L. monocytogenes* para formar biofilms en acero inoxidable, en condiciones similares a las que existen en industrias de procesamiento de productos de la pesca, es decir, hasta 10 días a 15°C, en un sustrato de jugos de pescado renovado periódicamente. Se formaron biofilms de *L. monocytogenes* con un cóctel de cuatro especies de *Pseudomonas* spp. (*P. fragi*, *P. savastanoi*, *P. putida* y *P. fluorescens*), y, a parte, junto con microbiota intrínseca procedente de dorada. Los resultados de los biofilms mixtos con *Pseudomonas* spp. fueron variables. En condiciones de cultivo monoespecie, *L. monocytogenes* alcanzó una población máxima de aproximadamente 6 log (UFC/cm²) a las 192 horas de incubación (8 días). Sin embargo, en presencia de toda la microbiota intrínseca del pescado, el patógeno nunca superó los 3 log (UFC/cm²). En conjunto, todos estos resultados aportan información sobre la dinámica de la población y resistencia de las células que forman los biofilms de *L. monocytogenes* en condiciones similares a las encontradas en las industrias de procesamiento de productos de la pesca. Estos comportamientos deben tenerse en consideración al diseñar y aplicar estrategias efectivas para el control de biofilms (Papaioannou et al., 2018). Será importante, pues, que en etapas posteriores del presente estudio se integren los resultados obtenidos en cuanto a microbiota dominante en las instalaciones de procesamiento de cerdo ibérico, de forma que se pueda evaluar la influencia de *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., algunas BAL y levaduras en la constitución completa de biofilms, como residentes mayoritarios, sobre la coexistencia con *B* y el posible predominio o inhibición de *L. monocytogenes*.

En otros sectores, como aproximación al desarrollo de un producto comercial, se deben realizar también otras comprobaciones a parte del efecto deseado. La tirotricina, por ejemplo, producida por *Brevibacillus parabrevis*, ejerce una capacidad antifúngica útil frente a

patógenos de plantas. Como acercamiento a su posible utilización como herramienta en agricultura, se estudió su toxicidad sobre las abejas, resultando no ser problemático ni para las abejas jóvenes ni para las adultas (Vosloo et al., 2017). Este dato también sería relevante para futuras etapas de desarrollo de un producto de biocontrol basado en *B* ya que se debe controlar que, al acabar en aguas residuales, no cause ningún efecto perjudicial para el medioambiente.

3.2 Efecto de la presencia de *B* en salchichones y chorizos a nivel organoléptico y sobre *L. monocytogenes* y otros indicadores microbianos (*challenge test*)

La biopreservación es una tecnología natural de conservación de alimentos, que consiste en inocular a los mismos con microorganismos seleccionados por sus propiedades antibacterianas (Leroi et al., 2015; Saraoui et al., 2017). En este estudio, se decidió valorar la capacidad de *B* para controlar una posible contaminación por *L. monocytogenes* en productos finales. En 1991, Buchanan y Klawitter (1991) ya determinaron la capacidad de *Carnobacterium piscicola*, una especie productora de bacteriocinas originalmente aislada de carne de vacuno picada, para inactivar a *L. monocytogenes*. Esta prueba se realizó mediante la generación de co-cultivos. Se inocularon, concretamente, 9 alimentos: leche UHT, latas de alimento para perros (a base de carne cocida), carne picada, carne picada irradiada, rollos de pollo, carne de cangrejo pasteurizada, crema de maíz en conserva y salchichas. Todos estos alimentos fueron inoculados con el patógeno y *C. piscicola*, e incubados a 5°C y 19°C. Las muestras fueron extraídas periódicamente y analizadas para el recuento de aerobios totales y de *L. monocytogenes*. Este patógeno no pudo crecer en la leche, el alimento para perros, la carne de cangrejo, la crema de maíz y las salchichas, almacenadas a 5°C. *C. piscicola* mostró ser menos inhibidor a 19°C. En la carne irradiada, este microorganismo inactivó el patógeno a 5°C y previno su crecimiento a 19°C. No se observó ninguna actividad atribuible a *C. piscicola* en la carne picada no irradiada ni en el rollo de pollo. Sin embargo, *L. monocytogenes* tampoco creció. *C. piscicola* fue menos efectivo en productos en los que la microbiota intrínseca fue reducida mediante un tratamiento térmico o de irradiación. Los autores indicaron que *C. piscicola* tiene potencial como herramienta complementaria para prevenir el crecimiento de *L. monocytogenes* en una gran variedad de productos alimenticios refrigerados, aunque parecen estar influyendo otros microorganismos presentes (Buchanan y Klawitter, 1991). En vista de ello, la búsqueda de nuevos microorganismos, que puedan

ejercer un control sobre el desarrollo de patógenos alimentarios en productos, es de gran interés, pues ofrecen alternativas ecológicas a implantar en el mercado, aspecto completamente crucial para las exigencias de los consumidores a día de hoy.

3.2.1 Recuento de *L. monocytogenes*

En cuanto a los recuentos de *L. monocytogenes* obtenidos en agar ALOA, a tiempo 0, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre todos los grupos. Esto indica que el inóculo se realizó de forma correcta, siendo equivalente en todos los grupos experimentales, tanto en los salchichones como en los chorizos.

Al cabo de una semana de almacenado de los salchichones, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre A y D, y C y D con recuentos superiores para el grupo A y C. No se observaron más diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las muestras de salchichones en los tiempos de análisis de 14, 28 y 45 días. No obstante, los recuentos de *L. monocytogenes* disminuyeron paulatinamente en los grupos almacenados a temperatura ambiente. De hecho, a los 90 días, el grupo B presentó un recuento medio menor respecto al grupo C, y, a su vez, el grupo C mostró una población mayor de *L. monocytogenes* respecto al grupo D (**Figura 31 – a**). Los resultados parecen indicar que a temperatura ambiente se produce una inhibición de este patógeno. De hecho, podría haber alguna especie mesófila que limitase el crecimiento de *L. monocytogenes*, pero que, al ser sensible a las temperaturas de refrigeración, no pudiera competir de forma adecuada en estas condiciones. Por otra parte, B no demostró tener ningún efecto en el desplazamiento del patógeno en el producto, ya que se observó la misma tendencia en los grupos control de *L. monocytogenes*. En este caso, B, al ser aeróbico estricto y mesófilo, no pareció encontrarse en condiciones favorables en las muestras envasadas al vacío (Panda et al., 2014).

En los chorizos, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) a los 7 y 14 días de análisis. A partir de los 28 días, ya no se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en los grupos mantenidos a temperatura ambiente, exhibiendo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos A y B a los 28 días; entre A y B, D; entre C y D a los 45 días; entre A y B, D; y entre C y B, D a los 90 días (**Figura 32 – a**). En este producto, la población de *L. monocytogenes* del grupo A se mantuvo claramente a lo largo de los 3 meses de estudio, siendo incluso superior al control. Estos resultados muestran que el efecto de la microbiota

presente en productos con pimentón, como el chorizo, sobre la inhibición de *L. monocytogenes* es dependiente de la temperatura de conservación. Es curioso observar que el impacto en el decrecimiento del patógeno, obteniendo recuentos de 0 log (UFC/g) desde los 28 días, tan sólo se observe en chorizo. De nuevo, el pimentón podría estar ejerciendo algún posible efecto potenciador que dé explicación a la diferencia con la tendencia encontrada en el salchichón. Estos resultados tendrían aplicaciones prácticas, puesto que la rotura de la cadena de frío, en chorizo y productos similares, podría ayudar a la seguridad del producto, aun cuando esté envasado en condiciones anaeróbicas y no loncheados.

3.2.2 Recuento de aerobios totales

En cuanto a los recuentos obtenidos de aerobios totales mediante sistema TEMPO en salchichones, el grupo C exhibió un recuento mayor en relación con los grupos A, B, D, E, F y producto control a 4°C a los 28 días (**Figura 31 - b**). El grupo control a 4°C mostró una población de aerobios totales significativamente menor que la de los grupos A, B, C, D, E y F a los 45 días. Esta diferencia era esperable ya que todos los otros grupos habían sido inoculados con uno o dos microorganismos. En los chorizos, a los 14 días, el recuento de aerobios totales del grupo C fue significativamente mayor en comparación con los grupos A, B, D, E, F y los dos grupos controles (**Figura 32 - b**).

Se identificó, además, una fuerte presencia de *Acinetobacter* spp. en todas las muestras de chorizos y a lo largo de todo el estudio. Esta identificación se realizó a partir de tinción de Gram, pruebas bioquímicas y kit API, como fue descrito en el Capítulo IV, sección 3.3. Este microorganismo proviene, muy probablemente, del pimentón ya que es la única diferencia existente con los salchichones, y no se aisló, en el presente estudio, de las superficies de la planta de producción. En otra investigación sobre la microbiota de los procesos de pelado y fermentación de la pimienta, mencionó que las especies fluctúan a lo largo del proceso, pero que dominaron *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (Hu et al., 2017).

3.2.3 Recuento de bacterias del ácido láctico

En los salchichones, se observaron pocas condiciones experimentales que presentaran diferencias significativas ($P < 0,05$) en relación con el recuento de bacterias del ácido láctico. Concretamente, a los 28 días del inicio de la prueba, el grupo A mostró un recuento

significativamente superior ($P < 0,05$) al presentado por el grupo D y por los controles en condiciones de refrigeración y a temperatura ambiente (**Figura 31 - c**). A los 45 días, las muestras del grupo A siguen presentando un recuento mayor que D, F y los controles del producto. En los chorizos, se observó el mismo fenómeno a los 45 días, el grupo A reveló tener una carga media mayor *versus* D, F y el control a temperatura ambiente (**Figura 32 - c**).

Múltiples estudios han evaluado la capacidad de las BAL de actuar como bioconservantes de alimentos y, especialmente, de productos de la pesca, ya que son productos, por lo general, altamente perecederos. Tomé et al. (2008) inocularon filetes de salmón ahumado con cinco bacterias del ácido láctico productoras de bacteriocinas (*E. faecium*, *Lactobacillus curvatus* ET06, *L. curvatus* ET30, *L. delbrueckii* ET32 y *Pediococcus acidilactici* ET34), seleccionadas por su capacidad de crecimiento *in vitro* en un medio con alto contenido en sal, baja temperatura y atmósfera anaeróbica, condiciones que simulan el pescado ahumado en frío, junto con *L. innocua*. El producto final se envasó al vacío y se almacenó a 5°C. El recuento de estas BAL y *L. innocua* fue realizado durante el almacenamiento. Los resultados mostraron que la cepa *E. faecium* ET05 demostró tener el mejor efecto como biopreservante para controlar el crecimiento de *L. innocua* en salmón ahumado en frío envasado al vacío. *L. curvatus* ET30 y *L. delbrueckii* ET32 también revelaron un buen potencial de biopreservación, aunque fueron menos efectivos que el primero. Este estudio describe una aplicación potencial de cinco BAL diferentes en la biopreservación de *Listeria* spp. (Tomé et al., 2008).

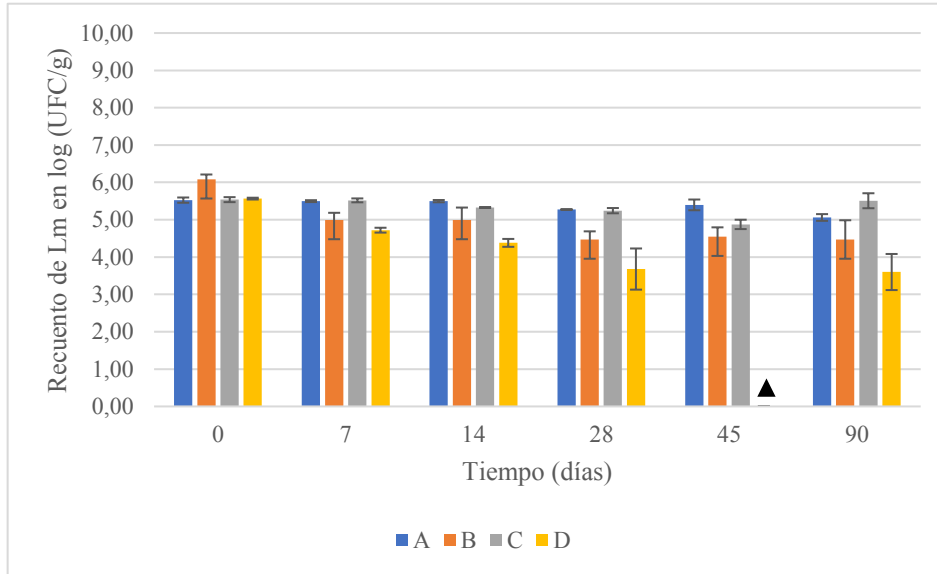
Otro estudio similar valoró el potencial de biopreservación de tres cepas de BAL productoras de sustancias antimicrobianas en salmón ahumado conservado en frío. *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* y *C. piscicola* fueron agregadas individualmente o en asociación en salmón ahumado, contaminado artificialmente con *L. innocua* y se almacenó al vacío durante 30 días a 4°C. Todos los cultivos lácticos fueron capaces de inhibir a *L. innocua* (alrededor de - 3 log (UFC/g) para todas las BAL), sin afectar negativamente la calidad sensorial del producto final (Vescovo et al., 2006). Nótese que el comportamiento de *L. innocua* es también muy interesante ya que esta especie puede constituir un reservorio de genes de resistencia que pueden ser transferidos entre especies bacterianas como, por ejemplo, *L. monocytogenes* (Gómez et al., 2014).

Curiosamente, la mayoría de los trabajos con bacterias lácticas se realizan sobre producto acabado, debido a que estos microorganismos tienen capacidad para implantarse en el producto. Esta situación puede ayudar a la seguridad del alimento elaborado, siempre que sea posible una implantación suficiente.

3.2.4 Recuento de levaduras

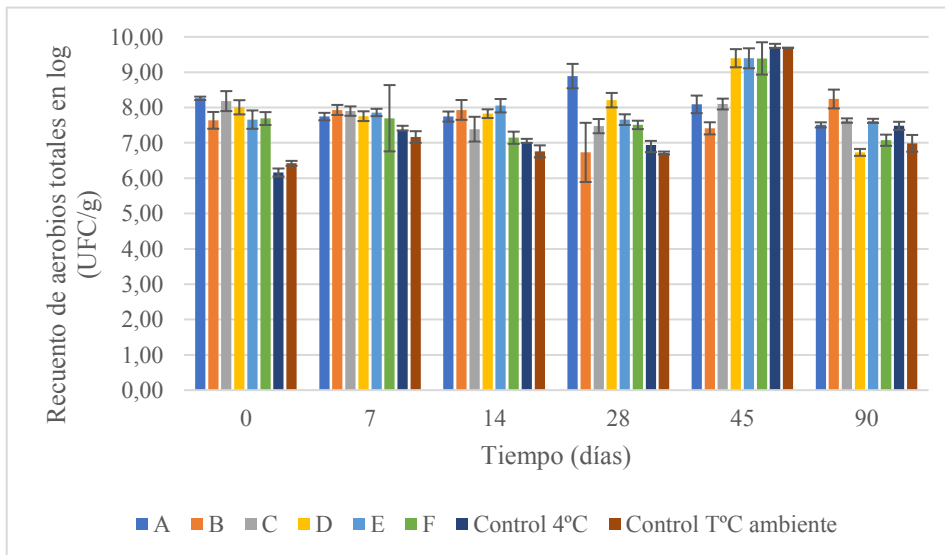
En los salchichones, los recuentos obtenidos en relación con los levaduras no presentaron grandes diferencias entre grupos experimentales a lo largo del tiempo. Sólo se observó una leve disminución de la población de este grupo microbiano a los 90 días. Estadísticamente, a los 45 días, el grupo F manifestó una carga menor *versus* A y C; y mayor frente a D y los grupos controles de producto no alterado (**Figura 31 - d**). En los chorizos, el grupo F mostró un mayor recuento respecto a las muestras A, C y D, respectivamente (**Figura 32 - d**). Otros autores valoraron específicamente el efecto de levaduras sobre *L. monocytogenes*. Goerges et al. (2006) co-cultivaron 14 levaduras, aisladas de un queso madurado, junto con *L. monocytogenes* en medio sólido. Todas las levaduras inhibieron de forma leve a este patógeno, probablemente debido a la competencia existente por los nutrientes. Sin embargo, una de las levaduras, *Candida intermedia*, pudo reducir el recuento de *L. monocytogenes* en 4 log (UFC/cm²). Otras tres cepas de *C. intermedia* y *Kluyveromyces marxianus* redujeron el crecimiento de *L. monocytogenes* en 3 log (UFC/cm²). La inhibición de *L. monocytogenes* fue claramente pronunciada en los co-cultivos, que simulaban las condiciones y las tasas de contaminación presentes en las superficies de un queso madurado. No encontraron evidencias de que la molécula inhibidora, no identificada, pudiese difundirse a través del agar.

a)

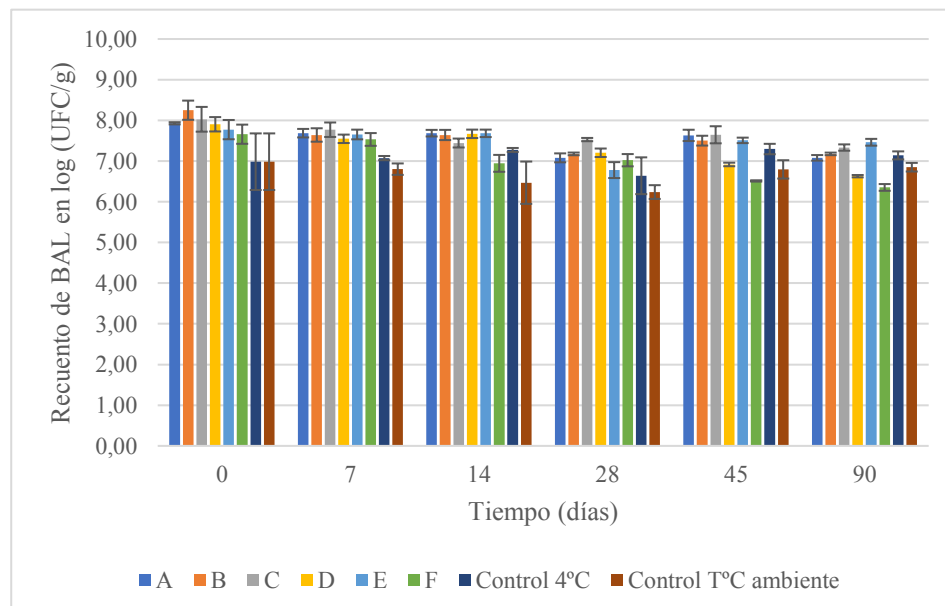


▲ : Grupo D a 45 días, recuento de 0 UFC/g de *L. monocytogenes* de media.

b)



c)



d)

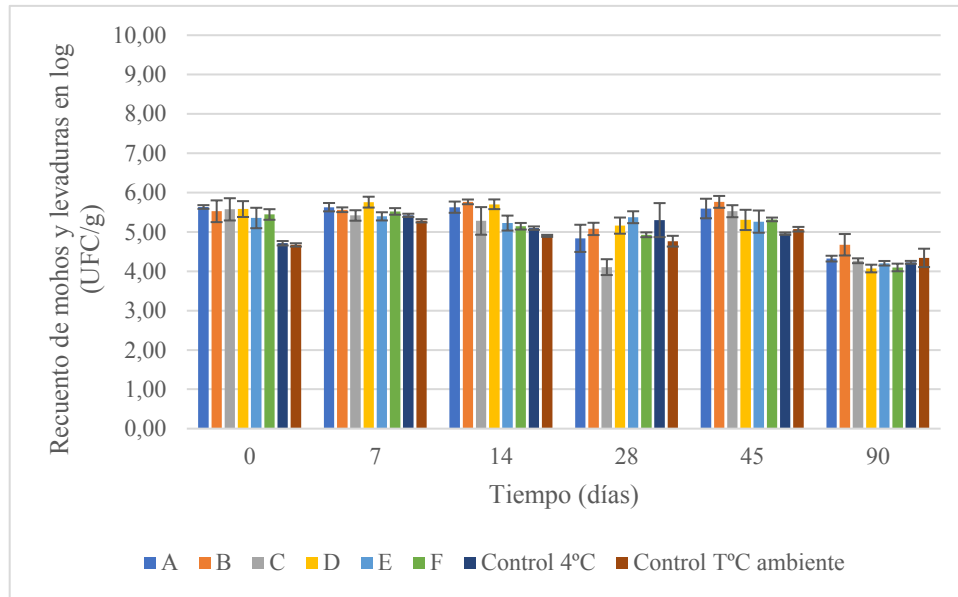
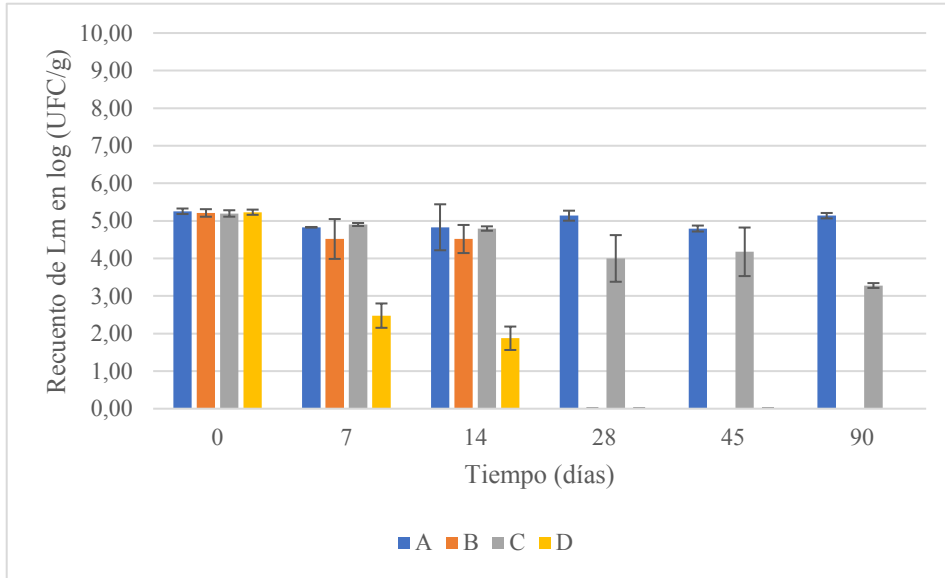
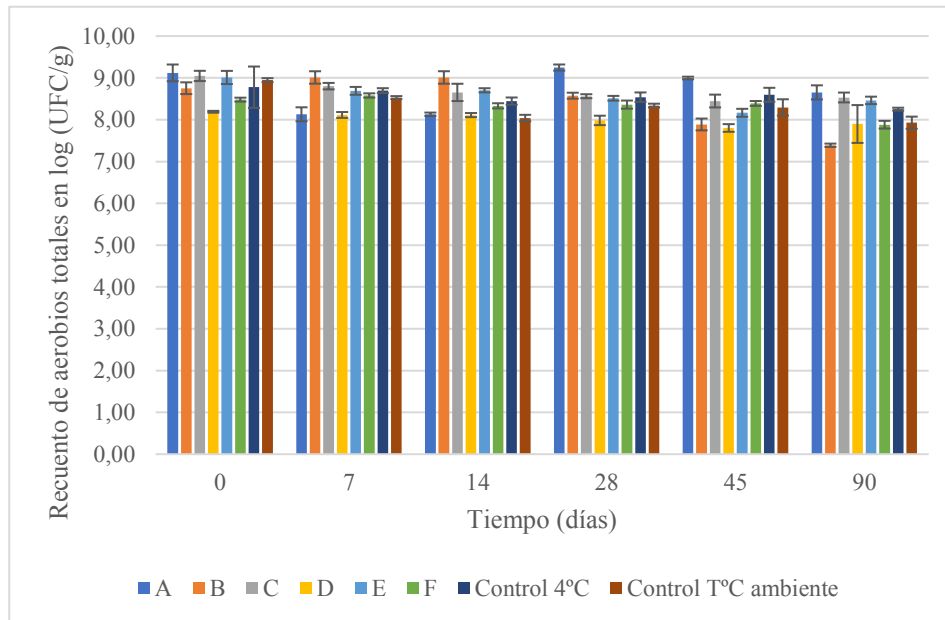


Figura 31. Recuento a partir de las muestras de salchichón de: a) *Listeria monocytogenes*; b) aerobios totales; c) bacterias del ácido láctico; y d) levaduras. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

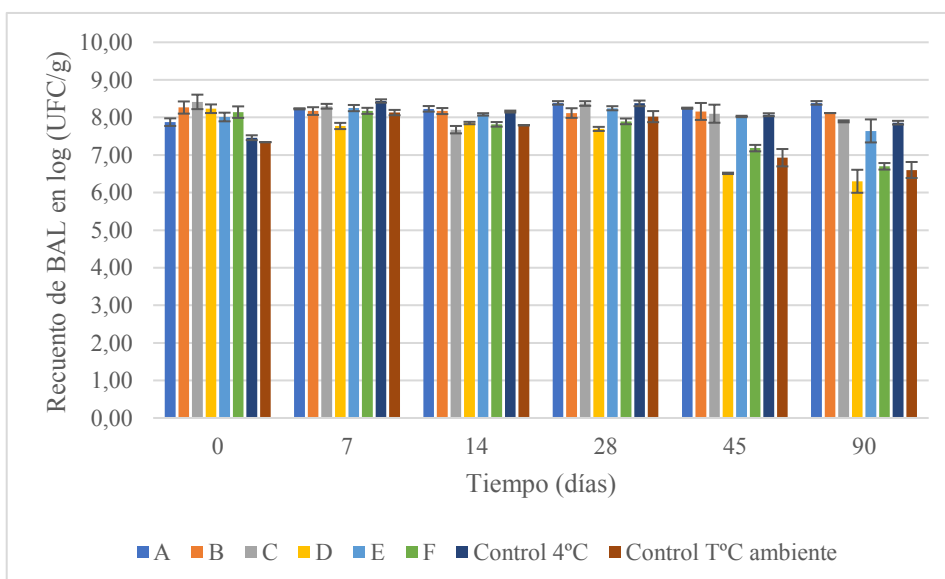
a)



b)



c)



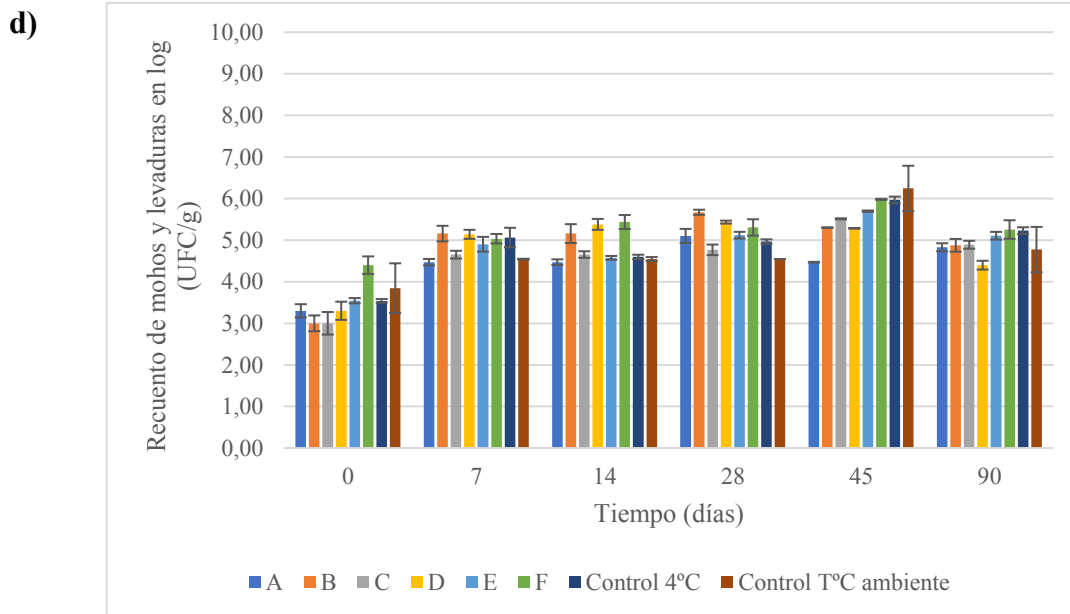


Figura 32. Recuento a partir de las muestras de chorizo de: a) *Listeria monocytogenes*; b) aerobios totales; c) bacterias del ácido láctico; y d) levaduras. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

3.2.5 Evolución organoléptica de las muestras de salchichón y chorizo

Para determinar la viabilidad de un microorganismo como bioconservador, es fundamental asegurarse de que éste no alterará sensorialmente al producto en el que estará destinado a ejercer su acción. En el presente estudio, las tres personas del panel no detectaron ningún olor desagradable o cambio en el aspecto de los productos en los grupos A, B, E y F, inoculados con *B*. No obstante, con el grupo C, a partir de los 28 días, notaron un olor desagradable, claramente diferente de las muestras control. Por consiguiente, el exceso de *L. monocytogenes* puede dar lugar a una alteración del producto. Sin embargo, la presencia de *Listeria* spp. no suele ser muy elevada, en muchas ocasiones en el límite de detección. Sin embargo, *B* no produjo ningún cambio de aroma, aunque esté en número elevado. A nivel de aspecto, las muestras de salchichón almacenadas en condiciones de refrigeración se oscurecieron y se secaron, siendo sobre todo llamativo a los 90 días. No obstante, no se apreciaron diferencias entre los diferentes microorganismos inoculados. En consecuencia, *B* no produce cambios organolépticos en el producto cuando se mantiene en condiciones anaeróbicas.

Beristain-Bauza et al. (2017) también recurrieron a un panel de personas para valorar organolépticamente los productos envasados con filmes proteicos suplementados con *L.*

sakei. En otro estudio, Leroi et al. (2015) seleccionaron varios microorganismos para mejorar la calidad del salmón ahumado conservado en frío. Los productos fueron evaluados por un panel de 12 personas capacitadas para valorar la calidad organoléptica de los productos a lo largo del estudio. Las muestras fueron envasadas al vacío y mantenidas a 8°C. *Photobacterium phosphoreum*, *B. thermosphacta* y *Serratia proteamaculans* son alterantes capaces de emitir fuertes olores, mientras que el potencial de deterioro de *Carnobacterium divergens* es más débil. Se comprobó también la capacidad alterante de los potenciales agentes de biocontrol *Lactococcus piscium* EU2241, *Leuconostoc gelidum* EU2247, *L. sakei* EU2885, *S. equorum* S030674 y cuatro starters comerciales. Se eliminaron, de hecho, dos especies debido al mal olor. Se probó entonces el efecto de las seis BAL seleccionadas contra los cuatro microorganismos alterantes mencionados anteriormente. El efecto protector de las BAL difería de un alterante a otro y no se pudo establecer una correlación entre la mejora sensorial, la inhibición de los microorganismos alterantes y los cultivos potencialmente protectores. Todas las BAL, excepto *L. piscium*, redujeron los malos olores emitidos por *P. phosphoreum* aunque algunos de ellos no tuvieron efecto sobre su crecimiento. Por otra parte, *S. equorum*, que no creció en el producto, favoreciendo la implantación de *P. phosphoreum*, aunque se evitaron la formación de olores desagradables. *L. piscium* fue la única cepa que impidió el deterioro de *B. thermosphacta* y *S. proteamaculans* pese a que no creció muy bien y no acidificó el producto. *L. gelidum* EU2247 inhibió el crecimiento de estos dos alterantes y redujo el pH, pero no tuvo efecto en la calidad sensorial del producto. Finalmente, se probó *L. piscium* en dos productos contaminados de forma natural, con un efecto positivo en un lote. Este efecto no se pudo correlacionar con el ecosistema microbiano (Leroi et al., 2015).

Algunos productos como los camarones son altamente perecederos. La biopreservación puede ser una técnica muy interesante para este tipo de productos. En este sentido, dos cepas de BAL fueron previamente seleccionadas para una estrategia de biopreservación: *L. piscium* CNCM I-4031, por su capacidad para prevenir el deterioro sensorial de los mariscos, y *C. divergens* V41, que inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes*. El objetivo de este estudio fue probar la asociación de estas dos cepas de BAL para mejorar tanto la calidad como la inocuidad de los camarones. Las dos especies de BAL fueron inoculadas solas o en un cóctel en camarones cocidos y pelados, a una carga de 5×10^5 UFC/g. Se efectuaron análisis químicos, sensoriales y microbiológicos de las muestras envasadas en atmósfera modificada y almacenadas a 8°C. El panel compuesto por 12 personas, con experiencia en la evaluación

de mariscos, fueron específicamente capacitadas para la evaluación sensorial de camarones. Los panelistas primero evaluaron el nivel de deterioro global en una escala continua de 0 a 10 (0 correspondiendo a productos no estropeados y 10 a fuertemente alterados), justo después de abrir la bolsa y 30 segundos más tarde. Finalmente, *L. piscium* redujo la población de *L. monocytogenes* de 1 log (UFC/g) en 28 días. Sin embargo, *C. divergens* tuvo un efecto bactericida inmediato que duró 7 días. Posteriormente, se observó un nuevo crecimiento de *L. monocytogenes*, pero el recuento se mantuvo siempre entre 2 y 5 log (UFC/g) más bajo que el control. No detectó, además, ningún efecto adicional o sinérgico entre estas especies de BAL. *C. divergens* fue muy eficaz para prevenir el deterioro sensorial de los camarones. Este efecto podría estar relacionado con la inhibición de *Shewanella* spp. y enterobacterias. Sin embargo, los panelistas pudieron detectar la presencia de *C. divergens* durante los primeros 10 días de almacenamiento, por la aparición de olores y sabores ligeramente desagradables. *L. piscium* mejoró la calidad sensorial de los camarones durante los primeros 14 días. En co-cultivo, *L. piscium* eliminó los olores liberados por *C. divergens* en los primeros días y el co-cultivo permitió mantener una buena calidad durante todo el tiempo de almacenado. Por lo tanto, los autores recomendaron el uso de un cóctel de *L. piscium* CNCM I-4031 y *C. divergens* V41 como estrategia de biopreservación de camarones (Saraoui et al., 2017).

4. Conclusión parcial

Se deben realizar, sin duda, un estudio más amplio, que permite definir las condiciones con las que *B* pueda generar biofilms completos en instalaciones alimentarias, con la finalidad de controlar la persistencia de *L. monocytogenes* en superficies de un entorno industrial real. El hecho de que en esta primera prueba efectuada en planta piloto no se hayan observado los mismos resultados que en las pruebas *in vitro*, no implica que no pueda ser una futura herramienta de control biológico en superficies. De hecho, con un bajo nivel de contaminación, se ha observado una cierta actividad de *B* contra *L. monocytogenes*, aunque sin que estas diferencias tengan significación estadística. Se deben ajustar aún los protocolos de aplicación (cargas, tiempos, materiales, condiciones ambientales favorables y nutrientes, entre otros). En cuanto a su papel como bioconservador de productos finales como salchichones y chorizos envasados al vacío no loncheados, sí que se podría decir que no es un microorganismo de interés para esta aplicación, aunque no se producen cambios organolépticos en el producto inoculado. Los resultados del *challenge test* han demostrado que, tanto a nivel de inocuidad frente a *L. monocytogenes* como a nivel organoléptico, es recomendable conservar estos productos, especialmente el chorizo, a temperatura ambiente, puesto que el patógeno reduce su recuento de forma significativa.

VIII. CONCLUSIONES

1. *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. dominaron la microbiota de las plantas de procesado de cerdo ibérico bajo estudio. La presencia de *L. lactis* ssp. *lactis* podría estar asociada a una baja contaminación por *Pseudomonas* spp., y *Lactobacillus* spp., al revés, podría estar coligado a una elevada proporción de *Pseudomonas* spp., lo que requerirá de evaluaciones posteriores. Se puede decir, además, que *L. mesenteroides* y *C. zeylanoides* fueron dos microorganismos ampliamente distribuidos en la planta estudiada. La composición de la microbiota láctica podría servir de indicador del tipo de perfil microbiológico de la superficie valorada.
2. El perfil microbiano de las áreas evaluadas en las plantas analizadas pudo relacionarse con la presencia de *L. monocytogenes*. La persistencia de este patógeno parece estar asociada con uno o más grupos bacterianos específicos como *Pseudomonas* spp. y enterobacterias que pertenecen a la microbiota residente en las superficies.
3. Conocer las especies que perduran en las plantas de producción y sus interacciones con *L. monocytogenes* pueden ayudar a perfeccionar los programas de limpieza y desinfección. El control de la microbiota que subsiste, después de los protocolos de higienización es, por lo tanto, un elemento clave para garantizar la inocuidad y la calidad de los productos finales.
4. Las pruebas preliminares, efectuadas con las especies identificadas a partir del análisis de la microbiota de las plantas bajo estudio, han permitido cribar la presencia de especies potencialmente interesantes, *B* y *R*, por su comportamiento contra *L. monocytogenes*.
5. Las interacciones entre especies difieren según el medio y las condiciones a las que se someten: medio de cultivo, estado planctónico o en biofilm, nivel de contaminación de los inóculos, temperatura y material de la superficie.
6. Los biofilms de *C. zeylanoides*, *P. luteola* y *P. fluorescens* (cepas aisladas de las instalaciones bajo estudio) no afectan a la implantación y desarrollo de biofilms de *L. monocytogenes*.

7. Los biofilms maduros preformados de *R*, aunque no favorecen la presencia de *L. monocytogenes*, no podrían ser utilizados como herramienta potente para el biocontrol del patógeno.
8. Los biofilms maduros preformados de *B* son capaces de inhibir la formación de biofilms de múltiples cepas de *L. monocytogenes*. Se requieren más estudios para conocer los mecanismos de acción responsables de este efecto, pero se sospecha que no sólo se debe a una simple competencia por espacio o nutrientes. En vista de las propiedades no enterotoxigénicas y no alterantes de productos finales, como salchichones y chorizos, favorecer la presencia de este microorganismo en las industrias cárnicas podría representar una vía más de control de la persistencia de *L. monocytogenes*, junto con operaciones de higiene apropiadas.
9. No se ha detectado la presencia de *L. monocytogenes* en suelos de instalaciones, debido a la afectación del material, lo que aumenta su porosidad. Cuando aumenta la porosidad del suelo, los microorganismos contaminan las capas profundas y no se detectan el/los patógeno/s por los sistemas de muestreo habituales, siendo un riesgo elevado de cara a la salud pública.
10. Los métodos de toma de muestra por frotis de superficie (esponjas y escobillado) no detectan la contaminación real de las superficies industriales, si éstas están afectadas o envejecidas. El empleo de estos sistemas llevará a una detección elevada de falsos negativos. En estos casos, la inocuidad de los alimentos pasa obligatoriamente por un correcto mantenimiento de la instalación.
11. Se debe continuar la investigación sobre la capacidad de *B* para controlar la formación de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies de entornos industriales reales. El hecho de que esta primera prueba, en planta piloto, no haya manifestado los mismos resultados que para las pruebas *in vitro* no implica que no pueda ser una futura herramienta de control biológico en superficies. Todavía se deben ajustar los protocolos de aplicación, cargas del inóculo, tiempo para la formación de biofilm, condiciones ambientales, materiales de superficie, método de muestreo y mantenimiento de los biofilms dentro de un nivel de contaminación de superficies aceptable.

12. *B* ha resultado no ser un bioconservador potencial de productos finales como salchichones y chorizos envasados al vacío, lo que demuestra que este microorganismo no produce sustancias con acción específica anti-*Listeria* en estas condiciones. No obstante, los resultados del *challenge test* han demostrado que tanto a nivel de inocuidad frente a *L. monocytogenes* como organolépticamente, es recomendable conservar estos embutidos frescos curados, no loncheados y envasados al vacío, a temperatura ambiente.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, R., 2018. *Pseudomonas*, Salem Press Encyclopedia of Health.
- Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, N., NACMCF, 2010. Parameters for determining inoculated pack/challenge. *J. Food Prot.* 73, 140–202.
- AECOC, 2018. Tendencias y retos en el sector cárnico [WWW Document].
- AENOR, 2015. ISO 13697. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de superficie no porosa para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividades.
- AFNOR, 2005. Validation certificate for alternative analytical method according to Standard EN ISO 16140: 2003, Certificate No. BIO 12/15-09/05: TEMPO TVC –method validated for the enumeration of viable aerobic mesophilic flora in food products.
- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2016. Enfermedades de transmisión alimentaria [WWW Document].
- Aguilar, C., Vanegas, C., Klotz, B., 2011. Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Dairy Res.* 78, 136–143.
- Aguilera-Arreola, M.G., Ostría-Hernández, M.L., Albarrán-Fernández, E., Juárez-Enriquez, S.R., Majalca-Martínez, C., Rico-Verdín, B., Ruiz, E.A., Ruiz-Palma, M. del S., Morales-García, M.R., Contreras-Rodríguez, A., 2018. Correct identification of *Ochrobactrum anthropi* from blood culture using 16rRNA sequencing: a first case report in an immunocompromised patient in Mexico. *Front. Med.* 5, 1–6.
- Agustín, M. del R., Brugnoli, L., 2018. Multispecies biofilms between *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* with resident microbiota isolated from apple juice processing equipment. *J. Food Saf.* e12499, 1–11.
- Ahmed, A.A., Sabiel, Y.A., 2016. Detection of microbial contamination of processed beef meat by using API strips and automated Vitek 2 compact system. *British Microbiol. Res. J.* 13, 1–8.
- Akya, A., Pointon, A., Thomas, C., 2009. Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70, 20–29.
- Alpkvist, E., Klapper, I., 2007. A multidimensional multispecies continuum model for heterogeneous biofilm development. *Bull. Math. Biol.* 69, 765–789.
- Althaus, D., Jermini, M., Giannini, P., Martinetti, G., Reinholz, D., Nüesch-Inderbilen, M., Lehner, A., Stephan, R., 2017. Local outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 4b sequence type 6 due to contaminated meat pâté. *Foodborne Pathog. Dis.* 14, 219–222.
- Andreevskaya, M., Jääskeläinen, E., Johansson, P., Ylinen, A., Paulin, L., Björkroth, J., Auvinen, P., 2018. Food spoilage-associated *Leuconostoc*, *Lactococcus*, and *Lactobacillus* species display different survival strategies in response to competition. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 1–16.
- Anónimo, 2018. Real Decreto 191/2018, de 6 de abril, por el que se establece la transmisión electrónica de datos de las prescripciones veterinarias de antibióticos destinados a animales productores de alimentos para consumo humano, y se modifican diversos reales decreto, Boletín Oficial del Estado.
- Anónimo, 2004a. Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- Anónimo, 2004b. Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea.
- Asociación nacional de las industrias de la carne de España (ANICE), 2017. El sector cárnico español [WWW Document].
- Asurmendi, P., García, M.J., Pascual, L., Barberis, L., 2015. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* by lactic acid bacteria isolated from brewer's grains used as feedstuff in Argentina.
- Awad, T.S., Asker, D., Hatton, B.D., 2018. Food-safe modification of stainless steel food-processing surfaces to reduce bacterial biofilms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 22902–22912.

- Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C., 2017. Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 313–351.
- Azizbekyan, R.R., Didenko, L. V., Smirnova, T.A., Kuzin, A.I., Shevlyagina, N. V., Zubasheva, M. V., Nikolaenko, M.A., 2015. Biofilm formation and sporulation in *Brevibacillus laterosporus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51, 866–872.
- Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L., Vogel, B.F., 2003a. Comparison of sodium hypochlorite - based foam and peroxyacetic acid - based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 66, 592–598.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C., Gram, L., 2003b. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries - analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 239–250.
- Baka, M., Noriega, E., Mertens, L., Van Derlinden, E., Van Impe, J.F.M., Derlinden, E. Van, Van Impe, J.F.M., 2014. Protective role of indigenous *Leuconostoc carnosum* against *Listeria monocytogenes* on vacuum packed Frankfurter sausages at suboptimal temperatures. *Food Res. Int.* 66.
- Balabanova, L., Son, O., Rasskazov, V., Noskova, Y., Tekutyeva, L., Eliseikina, M., Slepchenko, L., Nedashkovskaya, O., Podvolotskaya, A., 2017. Nucleolytic enzymes from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 with antibiofilm activity and biopreservative effect on meat products. *Food Control* 78, 270–278.
- Bañón, S., Martínez, A., López, A.M., 2011. Maduración de chorizo y salchichón de Chato Murciano con diferentes cultivos iniciadores (bacterias ácido-lácticas y estafilococos). *An. Vet. Murcia* 27, 101–118.
- Becton Dickinson and Company, 2015. Ficha técnica. BD BBL™ Crystal™ Identification Systems Rapid Gram-Positive ID Kit.
- Beristain-Bauza, S. del C., Mani-I, E., Palou, E., López-Malo, A., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A., 2017. Antimicrobial activity of whey protein films supplemented with *Lactobacillus sakei* cell-free supernatant on fresh beef. *Food Microbiol.* 62, 207–211.
- Beumer, R.R., Kusumaningrum, H., 2003. Kitchen hygiene in daily life. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 51, 299–302.
- Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F., Call, D.R., 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7336–7342.
- Briandet, R., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Steenkeste, K., 2008. Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2135–2143.
- Bridier, A., Sanchez-vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J., Naïtali, M., 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* 45, 167–178.
- Brooke, J.S., 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 1–41.
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 75, 1–13.
- Buchanan, R.L.L., Klawitter, L.A.A., 1991. Effectiveness of *Carnobacterium piscicola* LK5 for controlling the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in refrigerated foods. *J. Food Saf.* 12, 219–236.
- Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Kjelleberg, S., 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3916–3923.
- Cabral, C.C., Nunes Panzenhagen, P.H., Delgado, K.F., Rodrigues Alves Silva, G., Dos Prazeres Rodrigues,

- D., Franco, R.M., Conte-Junior, C.A., 2017. Contamination of carcasses and utensils in small swine slaughterhouses by *Salmonella* in the Northwestern Region of the State of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Prot.* 80, 1128–1132.
- Carpentier, B., 1997. Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. *Food Microbiol.* 14, 31–37.
- Carpentier, B., Cerf, O., 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 1–8.
- Carpentier, B., Chassaing, D., 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 111–122.
- Casella, T., Nogueira, M.C.L., Saras, E., Haenni, M., Madec, J.-Y., 2017. High prevalence of ESBLs in retail chicken meat despite of reduced use of antimicrobials in chicken production, France. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 271–275.
- Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C., Vignolo, G., 2017. Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: a focus on meat ecosystems and industrial environments. *Microorganisms* 5, 1–25.
- Celestina dos Santos, E.C., Neto, A.C., Silva Castro, V., Carvalho, R.C.T., Figueiredo, E.E. de S., 2017. Evaluation of the sanitary conditions of head meat, esophagus, diaphragm meat, and boning scrap processing. *J. Food Qual.* Article ID, 1–4.
- Chacon, R., Martinez, R., Dini Staliano, C., Diogo, A., Vieira, S., Lissete, M., Villarreal, M., Todorov, S.D., Marta, S., Saad, I., Dora, B., De, G., Franco, M., 2015. Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. *Food Microbiol.* 48, 143–152.
- Charlebois, A., Jacques, M., Boulianne, M., Archambault, M., 2017. Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. *Food Microbiol.* 62, 32–38.
- Cheney, R., 2018. *Corynebacterium*, Sale Press Encyclopedia of Health.
- Chevallier, I., Ammor, S., Laguet, A., Labayle, S., Castanet, V., Dufour, E., Talon, R., 2006. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control* 17, 446–453.
- Chmielewski, R.A.N., Frank, J.F., 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2, 22–32.
- Codex Alimentarius, FAO, W., 2015. Codex texts on antimicrobial resistance.
- Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., Rosa, H.J.D., 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 53–59.
- Collineau, L., Carmo, L.P., Endimiani, A., Magouras, I., Müntener, C., Schüpbach-Regula, G., Stärk, K.D.C., 2018. Risk ranking of antimicrobial-resistant hazards found in meat in Switzerland. *Risk Anal.* 38, 1070–1084.
- Combrouse, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Kol, O., Guérardel, Y., Midelet-Bourdin, G., 2013. Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1120–1131.
- Corbitt, A.J., Bennion, N., Forsythe, S.J., 2000. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 443–447.
- Coronel-León, J., Marqués, A.M., Bastida, J., Manresa, A., 2015. Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *J. Appl. Microbiol.* 120, 99–111.
- Costa, E.D.F., Corbellini, L.G., Paula, A., Poeta, S., Nauta, M., 2017. A stochastic model to assess the effect of meat inspection practices on the contamination of the pig carcasses. *Risk Anal.* 37, 1–13.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., 2001. Battling biofilms. *Sci. Am.* 285, 74–81.

- Coughlan, L.M., Cotter, P.D., Hill, C., Alvarez-Ordóñez, A., 2016. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.* 7, 1–21.
- Da Silva, E.P., De Martinis, E.C.P., 2013. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 957–968.
- Dantas, S.T.A., Rossi, B.F., Bonsaglia, E.C.R., Castilho, I.G., Hernandes, R.T., Fernandes, A., Rall, V.L.M., 2018. Cross-contamination and biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on various cutting boards. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 81–85.
- Dauphin, G., Ragimbeau, C., Malle, P., 2001. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 51–61.
- Davey, M.E., O’Toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280, 295–298.
- De Cesare, A., Parisi, A., Mioni, R., Comin, D., Lucchi, A., Manfreda, G., 2017. *Listeria monocytogenes* circulating in rabbit meat products and slaughterhouses in Italy: prevalence data and comparison among typing results. *Foodborne Pathog. Dis.* 14, 167–176.
- Deng, W., Quan, Y., Yang, S., Guo, L., Zhang, X., Liu, S., Chen, S., Zhou, K., He, L., Li, B., Gu, Y., Zhao, S., Zou, L., 2018. Antibiotic resistance in *Salmonella* from retail foods of animal origin and its association with disinfectant and heavy metal resistance. *Microb. Drug Resist.* 24, 782–791.
- Desjardine, K., Pereira, A., Wright, H., Maitainaho, T., Kelly, M., Andersen, R.J., 2007. Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis. *J. Nat. Prod.* 70, 1850–1853.
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A., 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1552–1561.
- Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A.R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A., 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control* 50, 930–936.
- Doijad, S.P., Barbuddhe, S.B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D.R., Kurkure, N. V., Rawool, D.B., Chakraborty, T., 2015. Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PLoS One* 10, 1–14.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emer. Infect. Dis.* 8, 881–890.
- Dortu, C., Huch, M., Holzappel, W.H., Franz, C.M.A.P., Thonart, P., 2008. Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 581–586.
- Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 130–141.
- Dourou, D., Simpson, C., Yoon, Y., Belk, K.E., Smith, G.C., Nychas, G.E., Sofos, J.N., 2011. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 262–268.
- Dubey, G.P., Ben-Yehuda, S., 2011. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* 144, 590–600.
- Dunn, K.A., Bielawski, J.P., Ward, T.J., Urquhart, C., Gu, H., 2009. Reconciling ecological and genomic divergence among lineages of *Listeria* under an “extended mosaic genome concept.” *Mol. Biol. Evol.* 26, 2605–2615.
- Dzieciol, M., Schornsteiner, E., Muhterem-Uyar, M., Stessl, B., Wagner, M., Schmitz-Esser, S., 2016. Bacterial diversity of floor drain biofilms and drain waters in a *Listeria monocytogenes* contaminated

- food processing environment. *Int. J. Food Microbiol.* 223, 33–40.
- Edwards, S.G., Seddon, B., 2001. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 652–659.
- EFSA, ECDC, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017, *EFSA Journal*.
- European Commission, 2001. 2001/471/EC: Commission Decision of 8 June 2001 laying down rules for the regular checks on the general hygiene carried out by the operators in establishments according to Directive 64/433/EEC on health conditions for the production and marketing of fresh, *Official Journal of the European Communities*.
- European Food Safety Authority, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in, *EFSA Journal*.
- European Food Safety Authority, n.d. *Listeria* [WWW Document].
- European Medicines Agency, 2019. Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals - Categorisation of antimicrobials (Draft).
- Evans, E.W., Redmond, E.C., 2018. Behavioral observation and microbiological analysis of older adult consumers' cross-contamination practices in a model domestic kitchen. *J. Food Prot.* 81, 569–581.
- Fagerlund, A., Mørseth, T., Heir, E., Briand, R., Langsrud, S., 2017. Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–21.
- FAO, 2019. Antimicrobial Resistance [WWW Document].
- FAO, 2006. Food Security. Policy brief.
- FAO, 1991. Anexo 6: Organizaciones internacionales y regionales. Directrices para reforzar los servicios de sanidad animal en los países en desarrollo. Roma.
- FAO, n.d. Chapter 2. Food security: concepts and measurement.
- Felgini, M., Panelli, S., Buffoni, J.N., Bonacina, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2012. Identification of microbiota present on the surface of Taleggio cheese using PCR-DGGE and RAPD-PCR. *Inst. Food Technol.* 77, 609–615.
- Fijan, S., Šostar-Turk, S., 2010. Antimicrobial activity of selected disinfectants used in a low temperature laundering procedure for textiles. *Fibres Text. East. Eur.* 18, 89–92.
- Fontecha-Umaña, F., 2014. Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Fortes, E.D., David, J., Koeritzer, B., Wiedmann, M., 2013. Validation of the 3M molecular detection system for the detection of *Listeria* in meat, seafood, dairy, and retail environments. *J. Food Prot.* 76, 874–878.
- Fratamico, P.M., Annous, B.A., Gunther, N.W., 2009. Biofilms in the food and beverage industries.
- Fung, D.Y.C., 2002. Rapid methods and automation in microbiology. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1, 3–22.
- Fuster-Valls, N., 2006. Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. *Universidad Autònoma de Barcelona*.
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, F., 2018. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* 9, 1–18.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 1–15.

- García-Almendárez, B.E., Cann, I.K.O., Martin, S.E., Guerrero-Legarreta, I., Regalado, C., 2008. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* 19, 670–680.
- García, J.P., Gil, J.E., Botero, S., G., F.E.V., 2018. Control de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en cultivo con *Lactobacillus plantarum*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 20, 68–77.
- Gerba, C.P., Kennedy, D., 2007. Enteric virus survival during household laundering and impact of disinfection with sodium hypochlorite. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4425–4428.
- Ghadbane, M., Harzallah, D., Laribi, A.I., Jaouadi, B., Belhadj, H., 2013. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable bacteriocin isolated from *Brevibacillus brevis* strain GM100. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 151–160.
- Ghidini, S., Colagiorgi, A., Ianieri, A., Di Ciccio, P., Zanardi, E., 2016. A look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix. *Microorganisms* 4, 1–12.
- Ghoul, M., Mitri, S., 2016. The ecology and evolution of microbial competition. *Trends Microbiol.* 24, 833–845.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., Nychas, G., 2013. Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLoS One* 8, 1–14.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretro, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.J., Kacániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., Simões, M., 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 6, 1–26.
- Giaouris, E.E., Simões, M. V, 2018. Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies, *Foodborne Diseases*. Elsevier Inc.
- Giraffa, G., Carminati, D., Tarelu, G.T., Torri Tareli, G., 1995. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. *J. Food Prot.* 58, 621–623.
- Gobierno de Navarra y CONSEBRO, 2012. Requisitos de las instalaciones de las industrias agroalimentarias. Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios de origen animal. Interpretación de la legislación.
- Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J.J., Rota, C., Ariño, A., Yangüela, J., 2014. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.* 42, 61–65.
- Gonçalves-Tenório, A., Silva, B., Rodrigues, V., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., 2018. Prevalence of pathogens in poultry meat: a meta-analysis of European published surveys. *Foods* 7, 1–16.
- González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A.G., Rodríguez-Jerez, J.J., 2018. Biofilms in the spotlight: detection, quantification, and removal methods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 1261–1276.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P.R., Beresford, T.P., Fenelon, M.A., Cotter, P.D., 2015. The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Front. Microbiol.* 6, 1–18.
- Gorman, R., Bloomfield, S., Adley, C.C., 2002. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 143–150.
- Gounadaki, A.S., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H., Nychas, G.E., 2008. Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiol.* 25, 313–323.
- Graziano Da Silva, J.G., 2019. No hay seguridad alimentaria sin inocuidad alimentaria. *Planeta Futur. EL PAÍS* 1–5.
- Grove, S.F., Suriyanarayanan, A., Puli, B., Zhao, H., Li, M., Li, D., Schaffner, D.W., Lee, A., 2015. Norovirus cross-contamination during preparation of fresh produce. *Int. J. Food Microbiol.* 198, 43–49.

- Grugel, C., Wallmann, J., 2004. Antimicrobial resistance in bacteria from food-producing animals. Risk management tools and strategies. *J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal.* 51, 419–421.
- Guerrero-Navarro, A.E., Ríos-Castillo, A.G., Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Felipe, X., Rodriguez Jerez, J.J., 2019. Development of a dairy fouling model to assess the efficacy of cleaning procedures using alkaline and enzymatic products. *LWT - Food Sci. Technol.* 106, 44–49.
- Guerrieri, E., de Niederhäusern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I., Bondi, M., 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control* 20, 861–865.
- Guillier, L., Stahl, V., Hezard, B., Notz, E., Briandet, R., 2008. Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 51–57.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., Tribedi, P., 2016. Biofilm, pathogenesis and prevention - a journey to break the wall: a review. *Arch. Microbiol.* 198, 1–15.
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P., 2016. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.* 7, 825.
- Habimana, O., Heir, E., Langsrud, S., Åsli, A.W., Møretrø, T., 2010. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4557–4559.
- Habimana, O., Meyrand, M., Meylheuc, T., Kulakauskas, S., Briandet, R., 2009. Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7814–7821.
- Hanlon, K.E., Miller, M.F., Guillen, L.M., Echeverry, A., Dormedy, E., Cemo, B., Branham, L.A., Sanders, S., Brashears, M.M., 2018. Presence of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 on the hide, and presence of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* in feces from small-ruminant (goat and lamb) samples collected in the United States, Bahamas and Mexico. *Meat Sci.* 135, 1–5.
- Hara, C.M.O., Rhoden, D.L., Miller, J.M., 1992. Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*: a new look at an old product. *J. Clin. Microbiol.* 30, 123–125.
- Hassan, J., 2018. Prevalence and characteristics of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from beef slaughterhouse. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 5, 218–225.
- Heir, E., Møretrø, T., Simensen, A., Langsrud, S., 2018. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *Int. J. Food Microbiol.* 275, 46–55.
- Hoodt, S.K., Zottola, E.A., 1997. Isolation and identification of adherent gram-negative microorganisms from four meat-processing facilities. *J. Food Prot.* 60, 1135–1138.
- Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., Gohar, M., 2010. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* 156, 1009–1018.
- Hu, Q., Zhang, J., Xu, C., Li, C., Liu, S., 2017. The dynamic microbiota profile during pepper (*Piper nigrum* L.) peeling by solid-state fermentation. *Curr. Microbiol.* 74, 739–746.
- Hultman, J., Rahkila, R., Ali, J., Rousu, J., Johanna, K., 2015. Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7088–7097.
- Hunt, S.M., Werner, E.M., Huang, B., Hamilton, A., Stewart, P.S., 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7418–7425.
- Ica, T., Caner, V., Istanbulu, O., Nguyen, H.D., Ahmed, B., Call, D.R., Beyenal, H., 2012. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1033–1038.
- Ismail, R., Aviat, F., Michel, V., Le Bayon, I., Gay-Perret, P., Kutnik, M., Fédérighi, M., 2013. Methods for

- recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 10, 6169–6183.
- Jahid, I.K., Ha, S., 2012. A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. *Food Sci. Biotechnol.* 21, 299–316.
- Jensen, D.A., Danyluk, M.D., Harris, L.J., Schaffner, D.W., 2017. Quantifying bacterial cross-contamination rates between fresh-cut produce and hands. *J. Food Prot.* 80, 213–219.
- Jessen, B., Lammert, L., 2003. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 51, 265–269.
- Kalso, R., 2019. *Proteus vulgaris*. Salem Press Encycl. Sci. 1–4.
- Kang, J., Liu, L., Wu, X., Sun, Y., Liu, Z., 2018. Effect of thyme essential oil against *Bacillus cereus* planktonic growth and biofilm formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 10209–10218.
- Kaplan, J.B., 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* 89, 205–218.
- Katase, M., Tsumura, K., 2011. Enumeration of micro-organisms in processed soy products with an automated most probable number method compared with standard plate method. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 539–545.
- Kemp, X. del C.A., 2007. Sensibilidad de *Listeria monocytogenes* frente a una bacteria ácido láctica y diferentes combinaciones de pH y NaCl. Universidad Austral de Chile.
- Kim, A., Young Park, S., Bae, S.-C., Oh, M.-H., Ha, S.-D., 2014. Survival of norovirus surrogate on various food-contact surfaces. *Food Environ. Virol.* 6, 182–188.
- Kim, T., Young, B.M., Young, G.M., 2008. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5466–5474.
- Kte'pi, B., 2017. *Bacillus* (bacteria), Salem Press Encyclopedia of Health.
- Kumar, C.G., Anand, S.K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 9–27.
- Laaksonen, S., Oksanen, A., Julmi, J., Zweifel, C., Fredriksson-Ahomaa, M., Stephan, R., 2017. Presence of foodborne pathogens, extended-spectrum β -lactamase - producing *Enterobacteriaceae*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in slaughtered reindeer in northern Finland and Norway. *Acta Vet. Scand.* 59, 1–8.
- Langsrud, S., Moen, B., Møretro, T., Løype, M., Heir, E., 2016. Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *J. Appl. Microbiol.* 120, 366–378.
- Lee, K.W.K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., Rice, S.A., 2014. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *Int. Soc. Microb. Ecol.* 8, 894–907.
- Leriche, V., Briandet, R., Carpentier, B., 2003. Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environ. Microbiol.* 5, 64–71.
- Leriche, V., Carpentier, B., 2000. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 88, 594–605.
- Leriche, V., Chassaing, D., Carpentier, B., 1999. Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 51, 169–182.
- Leroi, F., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Coeuret, G., Chaillou, S., Joffraud, J., 2015. Selection of bioprotective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 213, 79–87.
- Li, Y., Yang, L., Fu, J., Yan, M., Chen, D., Zhang, L., 2017. The novel loop-mediated isothermal amplification

- based confirmation methodology on the bacteria in viable but non-culturable (VBNC) state. *Microb. Pathog.* 111, 280–284.
- Lianou, A., Kakouri, A., Pappa, E.C., Samelis, J., 2017. Growth interactions and antilisterial effects of the bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* M104 and *Enterococcus faecium* KE82 strains in thermized milk in the presence or absence of a commercial starter culture. *Food Microbiol.* 64, 145–154.
- Lindsay, D., von Holy, A., 1997. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiol.* 14, 383–390.
- López, V., Navas, J., Martínez-Suárez, J. V., 2013. Low potential virulence associated with mutations in the *inlA* and *prfA* Genes in *Listeria monocytogenes* isolated from raw retail poultry meat. *J. Food Prot.* 76, 129–132.
- López, V., Ortiz, S., Corujo, A., López, P., Navas, J., Moreno, R., Martínez-Suárez, J. V., 2007. Traceback identification of an ingredient (pork dewlap) as the possible source of *Listeria monocytogenes* serotype 4b contamination in raw chicken products. *J. Food Prot.* 70, 1513–1517.
- López, V., Ortiz, S., Corujo, A., López, P., Poza, D., Navas, J., Moreno, R., Martínez-Suárez, J. V., 2008. Different contamination patterns of lineage I and II strains of *Listeria monocytogenes* in a Spanish broiler abattoir. *Poult. Sci.* 87, 1874–1882.
- Lorenzo-Cartón, F., Orihuel-Iranzo, E., Bertó-Navarro, R., López-Tormo, C., 2011. Control de la presencia de biofilms en las industrias alimentarias. *Aliment. Equipos y Tecnol.* 264, 43–47.
- Lourenço, A., Machado, H., Brito, L., 2011. Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12°C either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers. *J. Food Sci.* 76, 142–148.
- Loussaïf, L., Moigno, E., 2012. La perception de l’offre responsable par le consommateur français. Une étude exploratoire dans la grande distribution alimentaire. *Ethics Econ.* 9, 162–179.
- Luber, P., Brynestad, S., Topsch, D., Scherer, K., Bartelt, E., 2015. Quantification of *Campylobacter* species cross-contamination during handling of contaminated fresh chicken parts in kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 66–70.
- Maes, S., Heyndrickx, M., Vackier, T., Steenackers, H., Verplaetse, A., Reu, K. De, 2019. Identification and spoilage potential of the remaining dominant microbiota on food contact surfaces after cleaning and disinfection in different food industries. *J. Food Prot.* 82, 262–275.
- Mai-Prochnow, A., Webb, J.S., Ferrari, B.C., Kjelleberg, S., 2006. Ecological advantages of autolysis during the development and dispersal of *Pseudoalteromonas tunicata* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5414–5420.
- Mariam, S.S.H., Zegeye, N., Tariku, T., Andargie, E., Endalafer, N., Aseffa, A., 2014. Potential of cell-free supernatants from cultures of selected lactic acid bacteria and yeast obtained from local fermented foods as inhibitors of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. *BMC Res. Notes* 7, 1–9.
- Mariani, C., Oulahal, N., Chamba, J.F., Dubois-Brissonnet, Notz, E., Briandet, R., 2011. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control* 22, 1357–1362.
- Markantonis, N., Vasickova, P., Kubankova, M., Mikel, P., Botsaris, G., 2018. Detection of foodborne viruses in ready-to-eat meat products and meat processing plants. *J. Food Saf.* 38, 1–6.
- Marouani-Gadri, N., Augier, G., Carpentier, B., 2009. Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 62–67.
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., López-Alonso, V., 2016. Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Front. Microbiol.* 7, 638.

- Martínez T., M.A., Ovalle S., A., Reid S., I., Céspedes P., P., Martínez T., M.C., Gaete C., G., 2004. Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Gardnerella vaginalis*. Rev. Chil. Obstet. Ginecol. 69, 441–445.
- Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E., Simões, M., 2016. The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. Food Res. Int. 86, 140–146.
- Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2008. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. Int. J. Food Microbiol. 121, 157–168.
- Mertz, A.W., Kyung, O., Bryan, C.A.O., Morawicki, R., Sirsat, S.A., Neal, J.A., Crandall, P.G., Ricke, S.C., 2014. Microbial ecology of meat slicers as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. Food Control 42, 242–247.
- Miller, M.B., Blassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55, 165–199.
- Ministerio de Medio Ambiente, 2010. Ciclo de seminarios de análisis y prospectiva: el reto de la alimentación mundial en el siglo XXI.
- Moen, B., Røssvoll, E., Måge, I., Møretrø, T., Langsrud, S., 2016. Microbiota formed on attached stainless steel coupons correlates with the natural biofilm of the sink surface in domestic kitchens. Can. J. Microbiol. 62, 148–160.
- Montañez-Izquierdo, V., Ríos-Castillo, A.G., Fontecha-Umaña, F., Rodríguez-Jerez, J.J., 2012. Uso de sensores de superficie y métodos rápidos para controlar la contaminación ambiental en las industrias alimentarias: hacia el control on line.
- Montañez-Izquierdo, V.Y., Salas-Vázquez, D.I., Rodríguez-Jerez, J.J., 2012. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. Food Control 23, 470–477.
- Moore, G., Griffith, C., 2002. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. Food Microbiol. 19, 65–73.
- Møretrø, T., Langsrud, S., 2017. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 16, 1022–1041.
- Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E., 2013. Bacteria on meat abattoir process surfaces after sanitation: characterisation of survival properties of *Listeria monocytogenes* and the commensal bacterial flora. Adv. Microbiol. 3, 255–264.
- Møretrø, T., Schirmer, B.C.T., Heir, E., Fagerlund, A., Hjemli, P., Langsrud, S., 2017. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. Int. J. Food Microbiol. 241, 215–224.
- Mühlhauser, M., 2016. *Leifsonia aquatica*. Rev. Chil. infectología 33, 313–314.
- Muhterem-Uyar, M., Dalmasso, M., Bolocan, A.S., Hernandez, M., Kapetanakou, A.E., Kuchta, T., Manios, S.G., Melero, B., Minarovičová, J., Nicolau, A.I., Rovira, J., Skandamis, P.N., Jordan, K., Rodríguez-Lázaro, D., Stessl, B., Wagner, M., 2015. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. Food Control 51, 94–107.
- Nam, H., Seo, H.-S., Bang, J., Kim, H., Beuchat, L.R., Ryu, J.-H., 2014. Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* spores attached to and in a biofilm on stainless steel. Int. J. Food Microbiol. 188, 122–127.
- Ndlela, L.L., Oberholster, P.J., Wyk, J.H. Van, Cheng, P.H., 2018. Bacteria as biological control agents of freshwater cyanobacteria: is it feasible beyond the laboratory? Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 9911–9923.
- Nguyen, U.T., Burrows, L.L., 2014. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. Int. J. Food Microbiol. 187, 26–32.
- Niewczas, M., 2014. Consumers' reactions to food scares. Int. J. Consum. Stud. 38, 251–257.
- Nilsson, L., Hansen, T.B.B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knöchel, S., Gram, L., Gravesen, A.,

- Knochel, S., Gram, L., Gravesen, A., 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J. Appl. Microbiol.* 98, 172–183.
- Noll, M., Kleta, S., Al, S., Al Dahouk, S., 2018. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. *J. Infect. Public Health* 11, 572–577.
- Nostro, A., Roccaro, A.S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., Blanco, A.R., 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 56, 519–523.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.
- O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295–304.
- O'Shea, E.F., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2013. Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 130–134.
- Oloketuyi, S.F., Khan, F., 2017. Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilms - current knowledge and future outlooks. *J. Basic Microbiol.* 57, 728–743.
- OMS, 2019. Inocuidad de los alimentos. Normas alimentarias internacionales (Codex Alimentarius). [WWW Document].
- Organización Mundial de la Salud, 2019. Enfermedades de transmisión alimentaria [WWW Document].
- Organización Mundial de la Salud, 2018. Resistencia a los antimicrobianos [WWW Document].
- Organización Mundial de la Salud, 2015. Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria.
- Organización Mundial de la Salud, 2007. Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos.
- Organización Mundial de Sanidad Animal, 2019. “Una sola salud”: OIE - World Organization for Animal Health [WWW Document].
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 308–317.
- Ortiz, S., López, V., Martínez-suárez, J. V., 2014. The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 106–112.
- 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 Pathog. Dis.* 7, 1177–1184.
- Ortuño, R., 2012. Alertas y contaminación: la percepción del consumidor sobre la seguridad alimentaria [WWW Document]. AINIA.
- Padilla-Frausto, J.J., Cepeda-Marquez, L.G., Salgado, L.M., Iturriaga, M.H., Arvizu-Medrano, S.M., 2015. Detection and genotyping of *Leuconostoc* spp. in a sausage processing plant. *J. Food Prot.* 78, 2170–2176.
- Palmer, J., Flint, S., Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34, 577–588.
- Panda, A.K., Bisht, S.S., Mandal, S. De, Kumar, N.S., Gurusubramanian, G., Panigrahi, A.K., 2014. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105, 623–639.
- Papaioannou, E., Giaouris, E.D., Berillis, P., Boziaris, I.S., 2018. Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing

- conditions and chemical disinfection challenges. *Int. J. Food Microbiol.* 267, 9–19.
- Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L., Malm, A., 2014. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish J. Microbiol.* 63, 137–145.
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 27–33.
- Parsek, M.R., Singh, P.K., 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 677–701.
- Pereira, A., Mendes, J., Melo, L.F., 2008. Using nanovibrations to monitor biofouling. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 1407–1415.
- Pérez-Ibarreche, M., Castellano, P., Leclercq, A., Vignolo, G., 2016. Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. *FEMS Microbiol. Lett.* 363.
- Petty, H.R., 2007. Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microsc. Res. Tech.* 70, 687–709.
- Phillips, C.A., 2016. Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. *Int. J. Food Sci. Technol.* 51, 1731–1743.
- Poimenidou, S. V., Chrysadaku, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V.C., Nychas, G.-J., Skandamis, P.N., 2016. Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 237, 164–171.
- Popowska, M., Miernik, A., Rzczycka, M., Łopaciuk, A., 2010. The impact of environmental contamination with antibiotics on levels of resistance in soil bacteria. *J. Environ. Qual.* 39, 1679–1687.
- Pratt, L.A., Kolter, R., 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 598–603.
- Projahn, M., von Tippelskirch, P., Semmler, T., Guenther, S., Alter, T., Roesler, U., 2019. Contamination of chicken meat with extended-spectrum beta-lactamase producing-*Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* during scalding and defeathering of broiler carcasses. *J. Food Microbiol.* 77, 185–191.
- Puga, Carmen H., Dahdouh, E., SanJose, C., Orgaz, B., 2018a. *Listeria monocytogenes* colonizes *Pseudomonas fluorescens* biofilms and induces matrix over-production. *Front. Microbiol.* 9, 1–12.
- Puga, C.H., Orgaz, B., SanJose, C., 2016. *Listeria monocytogenes* impact on mature or old *Pseudomonas fluorescens* biofilms during growth at 4 and 20°C. *Front. Microbiol.* 7, 1–9.
- Puga, C. H., Rodríguez-López, P., Cabo, M.L., SanJose, C., Orgaz, B., 2018b. Enzymatic dispersal of dual-species biofilms carrying *Listeria monocytogenes* and other associated food industry bacteria. *Food Control* 94, 222–228.
- Quinto, E.J., Marín, J.M., Caro, I., Mateo, J., Scha, D.W., Schaffner, D.W., 2018. Bayesian modeling of two- and three-species bacterial competition in milk. *Food Re* 105, 952–961.
- Reich, F., Valero, A., Schill, F., Bungenstock, L., Klein, G., 2018. Characterisation of *Campylobacter* contamination in broilers and assessment of microbiological criteria for the pathogen in broiler slaughterhouses. *Food Control* 87, 60–69.
- Ribeiro, S.C., O'Connor, P.M., Ross, R.P., Stanton, C., Silva, C.C.G., 2016. An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481. *Int. Dairy J.* 63, 18–28.
- Ríos-Castillo, A.G., González-Rivas, F., Rodríguez-Jerez, J.J., 2017. Bactericidal efficacy of hydrogen peroxide-based disinfectants against Gram-positive and Gram-negative bacteria on stainless steel surfaces. *J. Food Sci.* 82, 2351–2356.
- Ripolles-Avila, C., 2018. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de contacto con alimentos: un abordaje multidisciplinar de un problema complejo. Universitat Autònoma de Barcelona.

- Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Guerrero-Navarro, A.E., Rodríguez-Jerez, J.J., 2018a. Establishment of incubation conditions to optimize the *in vitro* formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food Control* 92, 240–248.
- Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Martínez-Suárez, J.V., Capita, R., Rodríguez-Jerez, J.J., 2019. Evaluation of the microbiological contamination of food processing environments through implementing surface sensors in an iberian pork processing plant: an approach towards the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 99, 40–47.
- Ripolles-Avila, C., Ríos-Castillo, A.G., Guerrero-Navarro, A.E., Rodríguez-Jerez, J.J., 2018b. Reinterpretation of a classic method for the quantification of cell density within biofilms of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Exp.* 6, 70–75.
- Ripolles-Avila, C., Ríos-Castillo, A.G., Rodríguez-Jerez, J.J., 2018c. Development of a peroxide biodetector for a direct detection of biofilms produced by catalase-positive bacteria on food-contact surfaces. *CYTA - J. food* 16, 506–515.
- Røder, H.L., Raghupathi, P.K., Herschend, J., Brejnrod, A., Knøchel, S., Sørensen, S.J., Burmølle, M., 2015. Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiol.* 51, 18–24.
- Rothe, H., Rothenpieler, U., 2007. Peritonitis due to multiresistant *Rhizobium radiobacter*. *Perit. Dial. Int.* 27, 214–5.
- Rozhon, W., Khan, M., Poppenberger, B., 2012. The natural antibiotic resistances of the *Enterobacteriaceae* *Rahnella* and *Ewingella*. *InTech* 1–31.
- Ruban, S.W., Babu, R.N., Abraham, R.J.J., Senthilumar, T.M.A., Kumraswamy, P., Rao, V.A., 2018. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in retail buffalo meat in Chennai, India. *Buffalo Bull.* 37, 51–58.
- Ruiz, L., Alvarez-Ordóñez, A., 2017. The role of the food chain in the spread of antimicrobial resistance (AMR), Functionalized nanomaterials for the management of microbial infection. Elsevier Inc.
- Sadiq, F.A., Flint, S., Yuan, L., Li, Y., Liu, T.J., He, G.Q., 2017. Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *Int. J. Food Microbiol.* 262, 89–98.
- Salama, P.J., Embarek, P.K. Ben, Bagaria, J., Fall, I.S., 2018. Learning from *Listeria*: safer food for all. *Lancet* 391, 2305–2306.
- Salas-Vázquez, D.I., 2007. Evaluación de metodologías de control higiénico de superficies alimentarias y adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógeno. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Saraoui, T., Cornet, J., Guillouet, E., France, M., Chevalier, F., Joffraud, J., Leroi, F., 2017. Improving simultaneously the quality and safety of cooked and peeled shrimp using a cocktail of bioprotective lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 69–77.
- Saraoui, T., Fall, P.A., Leroi, F., Antignac, J.-P., Chéreau, S., Pilet, M.F., Ch Ereau, S., Pilet, M.F., 2016. Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Food Microbiol.* 53, 70–78.
- Sauders, B.D., D'Amico, D.J., 2016. *Listeria monocytogenes* cross-contamination of cheese: risk throughout the food supply chain. *Epidemiol. Infect.* 144, 2693–2697.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140–1154.
- Schäfer, D.F., Steffens, J., Barbosa, J., Zeni, J., Paroul, N., Valduga, E., Junges, A., Backes, G.T., Cansian, R.L., 2017. Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. *LWT - Food Sci. Technol.* 86, 393–398.
- Schön, K., Schornsteiner, E., Wagner, M., Müller, M., Schmitz-Esser, S., Dzieciol, M., Wagner, M., Müller,

- M., Schmitz-Esser, S., Sch, K., Müller, M., Schmitz-Esser, S., 2016. Microbial communities in dairy processing environment floor-drains are dominated by product-associated bacteria and yeasts. *Food Control* 70, 210–215.
- Senneby, E., Petersson, A.C., Rasmussen, M., 2012. Clinical and microbiological features of bacteraemia with *Aerococcus urinae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 546–550.
- Sharma, M., Anand, S.K., 2002. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol.* 19, 627–636.
- Silva, F., Pabla Martínez O., T., 2018. Complejo *Enterobacter cloacae*. *Rev. Chil. infectología* 35, 297–298.
- Silva O., F., 2011. *Aeromonas* spp. *Rev. Chil. infectología* 28, 157–158.
- Sirghani, K., Zeinali, T., Jamshidi, A., 2018. Detection of *Yersinia enterocolitica* in Retail Chicken Meat, Mashhad, Iran. *J. Pathog.* Article ID, 1–5.
- Skaarup, T., 1985. Slaughterhouse cleaning and sanitation. Rome.
- Smid, E.J., Lacroix, C., 2013. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 148–154.
- Snoussi, M., Talledo, J.P., Del Rosario, N.-A., Mohammadi, S., Ha, B.-Y., Košmrlj, A., Taheri-Araghi, S., 2018. Heterogeneous absorption of antimicrobial peptide LL37 in *Escherichia coli* cells enhances population survivability. *Elife* 7, 1–21.
- Song, Z., Liu, Q., Guo, H., Ju, R., Zhao, Y., Li, J., Liu, X., 2012. Tostadin, a novel antibacterial peptide from an antagonistic microorganism *Brevibacillus brevis* XDH. *Bioresour. Technol.* 111, 504–506.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., Kaper, J.B., 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8951–8956.
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S. Do, 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31, 572–585.
- Stellato, G., Stora, A. La, De Filippis, F., Borriello, G., Villani, F., Ercolini, D., 2016. Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4045–4054.
- Stewart, P.S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J.G., Lewandowski, Z., Ochsner, U.A., Hassett, D.J., 2002. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 836–838.
- Stiles, M.E., Ng, L.K., 1981. *Enterobacteriaceae* associated with meats and meat handling. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 867–872.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209.
- Sutherland, I.W., 1999. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 38, 319–328.
- Talon, R., Leroy, S., Lebert, I., 2007. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. *Meat Sci.* 77, 55–62.
- Techaruvichit, P., Takahashi, H., Kuda, T., Miya, S., Keeratipibul, S., Kimura, B., 2016. Adaptation of *Campylobacter jejuni* to biocides used in the food industry affects biofilm structure, adhesion strength, and cross-resistance to clinical antimicrobial compounds. *Biofouling* 32, 827–839.
- Tejera, D., Limongi, G., Bertullo, M., Cancela, M., 2016. *Ralstonia pickettii* bacteremia in hemodialysis patients: a report of two cases. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* 28, 195–198.
- Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifyazdi, H., Bossier, P., 2018. Effect of quorum quenching bacteria on growth, virulence factors and biofilm formation of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and an *in vivo* evaluation of their probiotic effect in rainbow trout. *J. Fish Dis.* 41, 1429–1438.
- Traoré, O., Springthorpe, V.S., Sattar, S.A., 2002. A quantitative study of the survival of two species of

- Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *J. Appl. Microbiol.* 92, 549–555.
- Tribedi, P., Sil, A.K., 2013. Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by *Pseudomonas* sp. AKS2. *J. Appl. Microbiol.* 116, 295–303.
- Ukuku, D.O., Fett, W.F., 2006. Effects of cell surface charge and hydrophobicity on attachment of 16 *Salmonella* serovars to Cantaloupe Rind and decontamination with sanitizers. *J. Food Prot.* 69, 1835–1843.
- Unión Europea, 2017. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) [WWW Document].
- Universidad de Granada, 2015. Métodos de análisis multivariante: análisis clúster [WWW Document].
- Vandera, E., Lianou, A., Kakouri, A., Feng, J., Koukkou, A.-I., Samelis, J., 2017. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* KE82, a multiple enterocin-producing strain, in different milk environments. *J. Food Prot.* 80, 74–85.
- Veen, S. Van Der, Abee, T., 2011. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 421–431.
- Vergne, A., Guérin, F., Lienhard, R., Le Coustumier, A., Daurel, C., Isnard, C., Marty, N., Poyart, C., Cattoir, V., 2015. Identification and clinical significance of *Helcococcus kunzii* in human samples. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2703–2705.
- Verraes, C., Boxstael, S. Van, Meervenue, E. Van, Coillie, E. Van, Butaye, P., Catry, B., Huffel, M.-A. de S.X. Van, Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., Block, J. De, Dewulf, J., Herman, L., 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 2643–2669.
- Vilar, I., Fontán, M.C.G., Prieto, B., Tornadijo, M.E., Carballo, J., 2000. A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product. *J. Appl. Microbiol.* 89, 1018–1026.
- Vosloo, J.A., Beims, H., Allsopp, M.H., Rensburg, W. Van, Ohe, W. Von Der, Steinert, M., Rautenbach, M., 2017. Tolerance of honey bee adults and larvae toward tyrothricin peptides derived from *Brevibacillus parabrevis*. *Apidologie* 48, 833–844.
- Wang, H., Wang, Huawei, Xing, T., Wu, N., Xu, X., Zhou, G., 2016. Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. *LWT - Food Sci. Technol.* 66, 298–304.
- Wang, R., Kalchayanand, N., Schmidt, J.W., 2013. Mixed biofilm formation by Shiga toxin – producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium enhanced bacterial resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances. *J. Food Prot.* 76, 1513–1522.
- Wang, X., Devlieghere, F., Geeraerd, A., Uyttendaele, M., 2017. Thermal inactivation and sublethal injury kinetics of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in broth versus agar surface. *Int. J. Food Microbiol.* 243, 70–77.
- Wang, X., Uyttendaele, M., Geeraerd, A., Steen, L., Fraeye, I., Devlieghere, F., 2016. Thermal inactivation kinetics of surface contaminating *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged agar surface and ready-to-eat sliced ham and sausage. *Food Res. Int.* 89, 843–849.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 295, 1487.
- Whitehead, K.A., Verran, J., 2015. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Curr. Opin. Food Sci.* 2, 84–91.
- WHO, 2015. Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria.
- WHO, 2007. Food safety and foodborne illness, World Health Organization. Geneva.
- Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, C., Brooks, T.D., Wilson, E., Clement, B., Wentworth, C.D., Holmes, A.E., 2017. Quantitative and

- qualitative assessment methods for biofilm growth: a mini-review. *Res Rev J Eng Technol.* 6, 1–42.
- Winkelströter, L.K., Gomes, B.C., Thomaz, M.R.S., Souza, V.M., Martinis, E.C.P. De, 2011. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control* 22, 1404–1407.
- Winkowski, K., Crandall, A.D., Montville, T.J., 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2552–2557.
- World Health Organization, n.d. Estimates of burden of foodborne disease – European perspective.
- Wu, X., Ballard, J., Jiang, Y.W., 2005. Structure and biosynthesis of the BT peptide antibiotic from *Brevibacillus texasporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8519–8530.
- Yang, F., Wang, L.H., Wang, J., Dong, Y.H., Hu, J., Zhang, L.H., 2005. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Lett.* 579, 3713–3717.
- Yang, X., Huang, E., Yuan, C., Zhang, L., Yousef, A.E., 2016. Isolation and structural elucidation of brevivacillin, an antimicrobial lipopeptide from *Brevibacillus laterosporus* that combats drug-resistant Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2763–2772.
- Yang, X., Yousef, A.E., 2018. Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 1–10.
- Yang, Y., Mik S-Krajnik, M., Zheng, Q., Lee, S.-B., Lee, S.-C., Yuk, H.-G., 2016. Biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. *Food Microbiol.* 54, 98–105.
- Zavala Moreno, A., Quiñónez Ramírez, E.I., Vázquez Salinas, C., 2005. La vida obscura de *Vibrio alginolyticus*. *Rev. Digit. Univ.* 6, 1–7.
- Zhao, T., Podtburg, T.C., Zhao, P., Schmidt, B.E., Baker, D.A., Cords, B., Doyle, M.P., 2006. Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3314–3320.
- Zilelidou, E.A., Skandamis, P.N., 2018. Growth, detection and virulence of *Listeria monocytogenes* in the presence of other microorganisms: microbial interactions from species to strain level. *Int. J. Food Microbiol.* 277, 10–25.

ANEXO

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

Artículos derivados de la tesis

Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Guerrero-Navarro, A.E., y Rodríguez-Jerez, J.J. (2018). Establishment of incubation conditions to optimize the *in vitro* formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food Control*, 92, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.054>

Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Martínez-Suárez, J.V., Capita, R., y Rodríguez-Jerez, J.J. (2019). Evaluation of the microbiological contamination of food processing environments through implementing surface sensors in an iberian pork processing plant: An approach towards the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 99, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.013>

Hascoët, A.S., Ripolles-Avila, C., Guerrero-Navarro, A.E., Cervantes-Huaman, B., Martínez-García, M. y Rodríguez-Jerez, J.J. (2019). Microbial ecology evaluation of an Iberian pig processing plant through implementing SCH sensors and its influence on *Listeria monocytogenes*. Enviado y pendiente de revisión por *Food Microbiology*.

Hascoët, A.S., Ripolles-Avila, C. y Rodríguez-Jerez, J.J. (2019). Biofilms of *Listeria monocytogenes* and resident microbiota in meat processing surfaces: a control tool or a threat? Artículo en preparación.

Artículos colaterales de la tesis

Ripolles-Avila, C., Cervantes-Huaman, B. H., Hascoët, A. S., Yuste, J., y Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Quantification of mature *Listeria monocytogenes* biofilm cells formed by an *in vitro* model: a comparison of different methods. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.020>

A.E. Guerrero-Navarro, A.G. Ríos-Castillo, C. Ripolles-Avila, A.S. Hascoët, X. Felipe, J.J. Rodríguez-Jerez. Development of a dairy fouling model to assess the efficacy of cleaning

procedures using alkaline and enzymatic products. LWT, 106, 44-49.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.057>

Contribuciones a congresos

Hascoët A.S., Ripolles-Avila C., Guerrero-Navarro A.E., Martínez-García M., Rodríguez-Jerez J.J. (2018). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a cell-free extract of cultured bacteria isolated from a meat industry. XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición “Alimentación 5S”, Barcelona (póster).

Hascoët A.S., Ripolles-Avila C., Guerrero-Navarro A.E., Martínez-García M., Rodríguez-Jerez J.J. (2018). Microbial ecology of biofilms presents at a pork meat industry with recurrent contamination of final products by *Listeria monocytogenes*. Food Micro Conference, Berlín (póster).

Hascoët, A.S.; Ripolles-Avila, C.; Cervantes-Huaman, B.; Mazaheri, T.; Rodríguez-Jerez, J.J. (2019). Evaluación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en salchichones y chorizos no loncheados almacenados a temperatura de refrigeración *versus* a temperatura ambiente. V Congreso Internacional de Calidad y Seguridad y Alimentaria ACOFESAL, Barcelona (póster).

Otros

Finalista del concurso: “Defensa la teva tesis en 4 minuts” de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, mayo de 2018.

