



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**IMPORTANCIA DEL CONTROL HIGIÉNICO DE LAS
SUPERFICIES ALIMENTARIAS MEDIANTE TÉCNICAS RÁPIDAS
Y TRADICIONALES PARA EVITAR Y/O MINIMIZAR LAS
CONTAMINACIONES CRUZADAS**

MEMORIA PRESENTADA POR NÚRIA FUSTER i VALLS

**PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR DENTRO DEL
PROGRAMA DE DOCTORADO DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS**

BELLATERRA, DICIEMBRE DEL 2006



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

JOSÉ JUAN RODRIGUEZ JEREZ y M^a MANUELA HERNANDEZ HERRERO, Profesores Titulares del Área de Nutrición y Bromatología del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Informan:

Que la memoria titulada **Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas**, presentada por Núria Fuster i Valls para optar al grado de Doctor por la “Universitat Autònoma de Barcelona”, ha estado 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, firman el presente certificado a Bellaterra, a 15 de Diciembre de 2006.

José Juan Rodríguez Jerez

M^a Manuela Hernández Herrero

*El momento elegido por el azar vale siempre
más que el momento elegido por nosotros
mismos*

Proverbio Chino

AGRADECIMIENTOS

A ti, Pepe, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y confiar en mi, dirigirlo y sobretodo aconsejarme en mis inquietudes laborales.

A ti, Manoli, por tu incansable colaboración en mi desarrollo personal como investigadora y por tu trabajo en la dirección de esta tesis. Gracias a ti, la tesis, hoy es una realidad.

A tu, Sílvia, pel recolzament incondicional que m'has brindat en tot moment. Vàrem iniciar el doctorat juntes i de les millors coses que me'n duc és la teva amistat.

A ti, Dora que llegaste en un momento muy difícil de mi vida y supiste ayudarme con tu bondad, generosidad y la amistad tan grande que me has regalado

A ti, Manuel, por tu paciencia y tus buenos consejos de vida que a pesar de la distancia, tu en México y yo en Madrid nuestra amistad perdurará para siempre.

A tu, Montse Mor-Mur, per consellar-me i vigilar que no abandonés “la redacció” a pesar de les meves inquietuds laborals.

A vosotros, Fabián, Luis, Adrián y Mercedes por ser buenos compañeros y compartir el espacio reducido del despacho del jefe.

A tu, Dolors, per una mestressa del laboratori excel·lent i discreta però sempre posant ordre al material que tants becaris hem hagut de compartir.

A vos, Martín, por regalarme los oídos con dulces palabras, por tu amistad argentina y tu paciencia con el termostato del laboratorio del microscopio.

Al resto de compañeros del departamento de Ciències dels Aliments (becarios/as profesoras, estudiantes, secretarias) por compartir buenos momentos en un camino largo y agotador.

To Dr.Sofos for giving me the chance to open my eyes to a new research world reality.

And my colleagues from the Meat safety department of Colorado State University.

To Faith for giving me her unconditional support in my American's adventure

A mis compañeras de trabajo en bioMérieux especialmente, Pilar y Lucía que vuestro apoyo incondicional desde el primer día en que Madrid iba a ser mi residencia y mi ciudad de trabajo y por la amistad que ha surgido entre una sevillana, zaragozana y catalana.

A les meves amigues veterinàries tan especials, Núria Mach, Nuria Chapinal, Rut i Marta....no tinc paraules simplement us estimo!!!!

Als meus pares, al meu germà preferit perquè son el millor que tinc en aquesta vida, la unió fa la força i l'amor que sento cap a la meva família es infinit i gràcies això he tirat endavant una etapa de la meva vida

A tu, Oriol que has tornat a donar sentit a la meva vida i has lloat constantment el treball que he realitzat. T'estimo.

RESUMEN

A pesar de que todavía no existe un documento legal que exija el control microbiológico de superficies, en la mayoría de ambientes del sector alimentario, cada vez más, el sector alimentario es consciente de la importancia que tiene verificar el plan de limpieza y desinfección. Así, los programas de limpieza y desinfección se diseñan con el objetivo de reducir, y en algunos casos, eliminar la carga bacteriana y restos de materia orgánica e inorgánica de las superficies alimentarias. De esta forma, se pretende minimizar el riesgo de contaminación cruzada para garantizar un producto seguro y de calidad. Actualmente, un factor a considerar en el diseño del plan de higienización es la eliminación de unas estructuras denominadas biofilms, las cuales, no se habían tenido en consideración hasta que no se han desarrollado sistemas que permiten realizar su detección.

Tanto es así que en los últimos años ha ido creciendo el interés en la investigación, desarrollo y/o mejora de técnicas rápidas, fiables y sencillas para evaluar la contaminación de superficies. Sin embargo, el conocimiento acerca de su validez en el uso industrial práctico es todavía escaso. Este trabajo describe y compara técnicas tradicionales y rápidas para evaluar la contaminación microbiológica en superficies y la formación de biofilms en condiciones experimentales, especialmente este estudio se ha llevado a cabo con microorganismos alterantes y patógenos como *L. monocytogenes* y posteriormente y con la experiencia adquirida, se ha llevado a cabo un estudio de monitorización y establecimiento de límites críticos en una industria alimentaria. Además, el trabajo destaca la importancia de aislar los microorganismos del ambiente industrial y las posibilidades y perspectivas de futuro para utilizar las técnicas descritas en el ambiente industrial como herramientas de verificación de la limpieza y control de superficies.

Por otra parte, este trabajo recoge la experiencia adquirida durante tres meses en el extranjero en la cual se evaluó la eficacia distintas sustancias antimicrobianas sobre piel de animales para su posible implantación dentro de los métodos de descontaminación de canales que se están regulados en Estados Unidos de América.

RESUM

Tot i que avui dia encara no existeix un document legal que exigeixi el control microbiològic en la majoria d'ambients industrials, cada vegada més, el sector alimentari es consciencia de la importància que té verificar el pla de neteja i desinfecció. L'objectiu del pla de neteja i desinfecció és reduir, i en alguns casos eliminar, la càrrega bacteriana i les restes de matèria orgànica i inorgànica de les superfícies alimentaries. D'aquesta manera, es pretén minimitzar el risc de contaminació creuada per a garantir un producte segur i de qualitat. Actualment, un factor a tenir en compte en el seu disseny és l'eliminació d'unes estructures denominades biofilms, les quals no s'havien tingut en consideració fins que no s'han desenvolupat sistemes que permeten realitzar la seva detecció.

Tant es així, que en els darrers anys, ha anat creixent l'interès en la investigació, desenvolupament i millora de tècniques ràpides, fiables y senzilles per avaluar la contaminació de superfícies. Malgrat tot, el coneixement sobre la seva validesa en l'ús pràctic industrial es escàs. Aquest treball descriu i compara les tècniques tradicionals i ràpides per avaluar la contaminació microbiològica en superfícies i la formació de biofilms en condicions experimentals. Especialment l'estudi s'ha dut a terme amb microorganismes alterants i patògens com *L. monocytogenes* i posteriorment, amb l'experiència adquirida, s'ha dut a terme un estudi de control i establiment de límits crítics microbiològics adequats a la indústria alimentaria. A més a més, el treball destaca la importància d'identificar els microorganismes propis del medi industrial i les possibilitats futures d'utilitzar aquestes tècniques en l'àmbit industrial com a eines de verificació de la higiene de superfícies.

D'altra banda, aquest treball recull l'experiència adquirida a l'estranger durant la qual es va avaluar l'eficàcia de diferents substàncies antimicrobianes sobre superfícies de pell de vacú inoculades amb *E. coli* O157:H7 i la possibilitat d'implantar-se dins dels mètodes de descontaminació de canals que estan regulats als Estats Units d'Amèrica.

ABSTRACT

Despite there is not a legal document demanding a microbiological control of surfaces, the concern on the importance of monitoring its hygiene sanitation is growing among most of alimentary industries. Consequently, most sanitation programs are designed to reduce, or even eliminate, the microbial contamination, and organic food debris of food surfaces. This measure is meant to minimize the recontamination risk to guarantee a safety product. Nowadays, a factor to take into account to design sanitation programs is a microbial community called biofilm which was omitted in the past until efficient tools to detect it were developed.

Therefore there is growing interest in research and development of novel tools to study, detect, and characterize microbes and biofilms in industrial environments. However, knowledge about their validity in practical industrial use is still scarce. This dissertation describes and compares traditional and rapid methods used to evaluate surface microbial contamination in laboratory conditions, later – using the acquired experience – a study of monitoring and microbiological criteria for food industry has been implemented. In addition the study addresses the importance of isolating microorganisms from industrial environment in order to reach more effective sanitation programs.

On the other hand, this dissertation describes the experience acquired during several months in the United States of America. During this research stage, the efficacy of several decontamination substances was evaluated on animal hides for its implementation in the regulated American decontamination carcasses.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
II. OBJETIVOS	7
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
1. Contaminación microbiana de los alimentos	11
2. Limpieza y desinfección	13
2.1. Aplicación del programa de limpieza y desinfección	13
2.2. Etapas de la limpieza y desinfección.....	15
2.3. Desinfección.....	15
2.3.1. Requisitos que debe cumplir un buen desinfectante	16
2.3.2. Principales familias de desinfectantes.....	17
2.3.3. Mecanismo de acción de los desinfectantes.....	18
2.3.4. Factores que afectan la acción de los desinfectantes.....	19
2.3.4.1. <i>El secado de las superficies como medida de prevención</i>	21
2.3.4.2. <i>Valoración de la eficacia de los desinfectantes</i>	22
2.3.5. Resistencias a los desinfectantes	24
2.3.5.1. <i>Incidencia de cepas resistentes en la industria alimentaria</i>	25
2.3.6. Biofilms.....	27
2.3.6.1. <i>Fases de desarrollo del biofilm</i>	28
2.3.6.2. <i>Factores que afectan al desarrollo del biofilm</i>	31
2.3.6.3. <i>Propiedades de las superficies de contacto</i>	32
2.3.6.4. <i>La protección: Resistencia a los biocidas</i>	33
2.3.6.5. <i>Microorganismos con capacidad de formar biofilms</i>	34
2.4. Métodos de verificación y vigilancia de la limpieza y desinfección.....	34
2.4.1. Importancia del muestreo y la identificación puntos de muestreo	34
2.4.2. Métodos clásicos	36
2.4.2.1. <i>Ventajas e inconvenientes de las técnicas clásicas</i>	36
2.4.3. Técnicas rápidas	38
2.4.3.1. <i>Características de las técnicas rápidas</i>	39
2.5. Aplicación de las técnicas rápidas para el control microbiológico e higiénico de superficies.....	40
2.5.1. Microscopia directa de epifluorescencia.....	40
2.5.1.1. <i>Clasificación de los microscopios de fluorescencia</i>	41
2.5.1.2. <i>Componentes principales</i>	43
2.5.1.3. <i>Principio de fluorescencia</i>	43
2.5.1.4. <i>Evaluación de la viabilidad de los microorganismos</i>	44
2.5.1.5. <i>Tinciones fluorescentes para determinar la integridad de membrana</i>	46
2.5.1.6. <i>Tinciones fluorescentes para determinar la actividad respiratoria</i>	47
2.5.1.7. <i>Tinciones fluorescentes para determinar la actividad enzimática</i>	47
2.5.1.8. <i>Recomendaciones de uso o empleo</i>	48

2.5.2. Métodos impedanciométricos	49
2.5.3. Medición de ATP por bioluminiscencia.....	50
3. Aplicación de sistemas de higienización en canales.....	52
3.1. Marco legal.....	52
3.2. Clasificación de los sistemas de descontaminación de canales.....	53
3.3. Sistemas de descontaminación ante-mortem.....	53
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Puesta a punto de la técnica de epifluorescencia. Efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia bacteriana.....	57
1.1. Diseño experimental.....	57
1.2. Superficies de evaluación y cepas bacterianas.....	58
1.3. Tinción vital de fluorescencia	58
1.4. Técnica de microscopia de epifluorescencia directa (DEM)	59
1.4.1. Captura, digitalización y análisis de imagen.....	59
1.5. Preparación de las muestras y análisis microbiológico.....	60
1.5.1. Validación del recuento de la técnica DEM.....	61
1.5.2. Efecto de las condiciones ambientales.....	61
2. Comparación de métodos rápidos y tradicionales para evaluar la higiene en superficies: estudio a nivel de laboratorio.....	63
2.1. Diseño experimental.....	63
2.2. Superficies de evaluación y preparación del inóculo	64
2.3. Preparación de las muestras y análisis microbiológico.....	65
2.4. Tinción vital LIVE/DEAD [®] y técnica DEM.....	65
2.5. Técnica de bioluminiscencia	65
2.6. Técnica de escobillonado	66
2.7. Técnica de impedancia.....	67
2.8. Determinación de la presencia de células lesionadas.....	67
3. Verificación de la limpieza y desinfección de una industria alimentaria mediante diferentes métodos de control.....	68
3.1. Diseño experimental.....	68
3.2. Características de la industria alimentaria.....	69
3.3. Superficies de trabajo	69
3.4. Plan de muestreo	72
3.5. Análisis microbiológico de las superficies de trabajo.....	74
3.6. Aislamiento e identificación de la flora bacteriana residente	74

4. Aplicación de tratamientos de descontaminación en superficies vivas (piel de vacuno)	76
4.1. Diseño experimental.....	76
4.2. Obtención de las muestras y preparación del inóculo	77
4.3. Preparación y aplicación de las soluciones de descontaminación.....	77
4.4. Tratamientos de descontaminación	78
4.4.1. Efecto del tiempo de contacto del desinfectante	78
4.5. Análisis microbiológico	79
4.6. Identificación microbiana.....	80
5. Análisis estadístico.....	81
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
1. Puesta a punto de la técnica de epifluorescencia. Efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia bacteriana.....	85
1.1. Validación de la técnica DEM con el recuento en placa.....	85
1.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia bacteriana	87
1.2.1. Supervivencia de microorganismos en condiciones húmedas	87
1.2.2. Supervivencia de microorganismos sometidos a desecación lenta	90
1.2.3. Supervivencia de microorganismos sometidos a desecación rápida.....	92
2. Comparación de métodos rápidos y tradicionales para evaluar la higiene en superficies: estudio a nivel de laboratorio.....	95
2.1. Recuperación de <i>L. monocytogenes</i> mediante la técnica de escobillonado y recuento en placa.....	95
2.2. Aplicación de la microscopía de epifluorescencia directa (DEM).....	98
2.3. Aplicación de la impedancia en la detección de microorganismos en superficies....	100
2.4. Aplicación de la bioluminiscencia para la detección de microorganismos en superficies.....	103
2.5. Detección y recuperación de células lesionadas de <i>L. monocytogenes</i>	105
3. Verificación de la limpieza y desinfección de una industria alimentaria mediante diferentes métodos de control.....	107
3.1. Aplicación de la microscopía de epifluorescencia directa	107
3.2. Aplicación de la técnica de escobillonado y determinación del ATP	117
3.2.1. Establecimiento de límites microbiológicos y de ATP	118
3.3. Evaluación del estado higiénico de las superficies de trabajo	119
3.3.1. En función del día de ensayo.....	119
3.3.2. En función de la zona de muestreo.....	120
3.3.3. En función de tipo de material de las superficies.....	124
3.4. Aplicación de la técnica de impedancia	126
3.5. Aislamiento e identificación de la microbiota tras la higienización de la planta	128

4. Aplicación de tratamientos de descontaminación en superficies vivas (piel de vacuno)	134
4.1. Efecto del Tween 20 combinado con un desinfectante en la descontaminación de la piel de vacuno inoculado con <i>E. coli</i> O157:H7.....	134
VI. CONCLUSIONES	143
VII. BIBLIOGRAFIA	149

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Brotos alimentarios producidos por contaminación cruzada de superficies.....	12
Tabla 2.	Criterios y métodos para evaluar la viabilidad de los microorganismos.....	45
Tabla 3.	Características de los filtros ópticos.....	59
Tabla 4.	Características de la instalación y del proceso de la industria estudiada.....	69
Tabla 5.	Identificación de las superficies de trabajo estudiadas.....	70
Tabla 6.	Programa de limpieza y desinfección aplicado a las zonas de trabajo.	72
Tabla 7.	Valor de pH de las muestras de piel descontaminadas y neutralizadas.	79
Tabla 8.	Comparación del tamaño medio (media \pm desviación estándar) de las bacterias libres y dentro del biofilm mediante análisis de imagen.....	89
Tabla 9.	Tasa de recuperación de <i>L. monocytogenes</i> en función del número de escobillonados y el método de agitación (media \pm desviación estándar).....	96
Tabla 10.	Comparación entre la técnica DEM y el escobillonado y recuento placa en la recuperación de <i>L. monocytogenes</i> de inoculada en discos de acero inoxidable (media \pm desviación estándar).....	99
Tabla 11.	Comparación entre TD de <i>L. monocytogenes</i> recuperada sobre una superficie respecto al TD obtenido en la calibración de <i>Listeria spp</i> (media \pm desviación estándar).	102
Tabla 12.	Recuperación de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en acero inoxidable utilizando el método de detección de ATP por Bioluminiscencia (media \pm desviación estándar).	104
Tabla 13.	Efecto de la sal suplementada en los medios BHIAYE y GPM sobre el crecimiento <i>L. monocytogenes</i> (media \pm desviación estándar).....	106
Tabla 14.	Recuento medio por zona de bacterias vivas y lesionadas/muertas adheridas al disco tras la higienización analizado mediante microscopia (media \pm desviación estándar).	108
Tabla 15.	Recuentos de bacterias vivas y lesionadas/muertas adheridas a los discos tras la higienización, distribuidos en 24 puntos de la planta analizados mediante microscopia (media \pm desviación estándar).	109
Tabla 16.	Nivel medio de contaminación microbiana y de ATP de las superficies en función del día de ensayo (media \pm desviación estándar).	120

Tabla 17.	Nivel medio de contaminación microbiana y de ATP de las superficies en función de la zona (media \pm desviación estándar).....	121
Tabla 18.	Nivel de contaminación microbiana y de ATP de todas las superficies de trabajo evaluadas mediante hisopado y recuento en placa y bioluminiscencia (media \pm desviación estándar).....	122
Tabla 19.	Porcentaje de superficies de trabajo en función del límite microbiológico y valor de ATP establecido.....	123
Tabla 20.	Nivel de recuento microbiano en función de las características del material de la superficie (media \pm desviación estándar).....	124
Tabla 21.	Porcentaje de superficies de los distintos materiales en función del límite microbiológicos y valor de ATP establecido.	125
Tabla 22.	Identificación de la microbiota adherida en las superficies de trabajo tras la limpieza y desinfección.....	129
Tabla 23.	Microbiota dominante después de la limpieza y desinfección en función de la zona de trabajo.....	130
Tabla 24.	Eficacia del ácido láctico y del hidróxido sódico con y sin Tween 20, en la reducción decimal de <i>E. coli</i> 0157:H7 inoculado en piel de vacuno (media \pm desviación estándar).....	136
Tabla 25.	Microbiota aislada de la piel tras la descontaminación.....	137
Tabla 26.	Efecto de diferentes tiempos de espera sobre la reducción del recuento de <i>E. coli</i> O157:H7 (media \pm desviación estándar).....	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fases de formación de un biofilm.	31
Figura 2.	Paso de la luz a través de un microscopio de fluorescencia de transmisión (A) y un microscopio de epifluorescencia (B). Modificado por Herman (1998).	42
Figura 3.	Diseño experimental de la puesta a punto de la técnica de epifluorescencia y del estudio del efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia bacteriana.....	57
Figura 4.	Ajuste de umbral de la imagen (a) Imagen sin tratar, (b) Ajuste de las células teñidas de rojo (muertas/lesionadas), (c) Ajuste de las células teñidas de verde (vivas), (d) Ajuste del fondo.	60
Figura 5a.	Diseño experimental del estudio de comparación de métodos de control de higiene de superficies en condiciones de laboratorio.....	63
Figura 5b.	Protocolo de recuperación de <i>L. monocytogenes</i> de la superficie.	64
Figura 6.	Protocolo escobillonado mediante la técnica bioluminiscencia.	66
Figura 7.	Diseño experimental del estudio comparativo de métodos rápidos y tradicionales para verificar el programa de higienización de una industria alimentaria.....	68
Figura 8.	Mesa de manipulación de polietileno liso y la cinta de alineación de polietileno articulado ubicadas en la zona de Elaboración y envasado; (c) y (d): mesas de despiece de polietileno liso y acero inoxidable y a la cinta ULMA de polietileno liso ubicadas en la zona de carne; (e) y (f) mesas de emplatado de acero inoxidable la mesa de preparación de ingredientes de acero inoxidable ubicadas en la zona de la cocina.....	71
Figura 9.	Las imágenes ilustran la colocación de los discos de acero inoxidable de forma aséptica. (a) y (b): elaboración-ensado, (c) (d): carne, (e) y (f): cocina.....	73
Figura 10.	Esquema del sistema de identificación de los microorganismos aislados.....	75
Figura 11.	Diseño experimental del estudio para evaluar el grado de descontaminación de piel de vacuno inoculada con <i>E. coli</i> O157: H7.	76
Figura 12.	Recta de regresión lineal del recuento mediante microscopia epifluorescencia directa (células viables/cm ²) y recuento en placa (ufc/ cm ²).....	86

Figura 13.	Evolución de la supervivencia y desarrollo de microorganismos en superficies de acero inoxidable bajo condiciones de humedad.....	88
Figura 14.	Imágenes captadas con un microscopio de epifluorescencia directa y teñidas con Live/Dead [®] . (a) <i>E. cloacae</i> ; (b) <i>P. aeruginosa</i> ; (c) <i>S. aureus</i> . Las imágenes ilustran un biofilm desarrollado en 24 h en condiciones húmedas.	88
Figura 15.	Evolución y desarrollo de los microorganismos en superficies de acero inoxidable sometidos a condiciones de desecación ambiental.....	92
Figura 16.	Las imágenes ilustran el efecto de la desecación ambiental a las 24 h sobre el desarrollo y supervivencia de las bacterias. (a) <i>E. cloacae</i> ; (b) <i>P. aeruginosa</i> ; (c) <i>S. aureus</i>	92
Figura 17.	Supervivencia de microorganismos en una superficie de acero inoxidable sometido a condiciones de desecación rápida.....	94
Figura 18.	Las imágenes ilustran el efecto de la desecación rápida a las 24 h sobre la supervivencia de las bacterias. (a) <i>E. cloacae</i> ; (b) <i>P. aeruginosa</i> ; (c) <i>S. aureus</i>	94
Figura 19.	Recta de regresión del recuento de <i>L. monocytogenes</i> en placa log (ufc/ml) respecto al tiempo de detección (TD) obtenido por impedancia. (a) protocolo 1 y (b) protocolo 2.....	100
Figura 20.	Imágenes de epifluorescencia de bacterias y suciedad adherida a discos de acero inoxidable distribuidos por la zona de carne.....	110
Figura 21.	Imágenes de epifluorescencia de bacterias y suciedad adherida a discos de acero inoxidable distribuidos por la zona de elaboración y envasado.	112
Figura 22.	Imágenes de epifluorescencia de bacterias y suciedad adherida a discos de acero inoxidable distribuidos por la zona de la cocina.	114
Figura 23.	Recuentos de microorganismos aerobios incubados a dos temperaturas (30 y 8° C) obtenidos tras el hisopado y análisis en placa.....	117
Figura 24.	Recta de calibración del tiempo de detección (TD) respecto al recuento bacteriano log (ufc/100 cm ²) recuperado de las superficies de trabajo (n=187).	127

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La mayoría de peligros biológicos presentes en el producto acabado son debidos a fenómenos de contaminación cruzada. Tanto es así que un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (WHO (World Health Organisation), 1995) en el ámbito europeo, se determinó que casi un 25% de los brotes de toxiinfección alimentaria se asociaban a contaminaciones cruzadas (Kusumaningrum y cols., 2003). Por contaminación cruzada se entiende la transmisión de microorganismos de un alimento a otro de forma directa o indirecta y adquiere su máximo riesgo cuando se produce a partir de alimentos crudos y como consecuencia de una higiene inadecuada contaminan alimentos elaborados o listos para el consumo. En este caso los posibles microorganismos patógenos se encuentran con muy pocas barreras y pueden multiplicarse hasta niveles de riesgo (Reij y Den Aantrekker, 2004). Las vías de contaminación más frecuentes son los manipuladores, las superficies de contacto y/o equipos, las materias primas sin procesar y los vectores.

Las bacterias que colonizan las superficies pueden actuar de reservorio de microorganismos alterantes, como *Pseudomonas aeruginosa* (Bagge-Ravn y cols., 2003a) y/o patógenos como por ejemplo *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* (Reij y Den Aantrekker, 2004). A su vez, pueden contaminar productos alimenticios o canales directamente a través del ambiente de procesado y pueden sobrevivir, incluso, al tratamiento de limpieza y desinfección especialmente si forman biofilms (Frank y Koffi, 1990). Si consideramos que los biofilms son comunidades de microorganismos que sintetizan una serie de sustancias que les confieren estabilidad, nutrición y protección frente agentes hostiles, con implicaciones directas o indirectas sobre la salud de los consumidores, podremos comprender la necesidad de adoptar medidas de higiene más específicas respecto a los programas de higienización de superficies y la necesidad de emplear métodos de control que nos permitan verificar su eficacia de forma rápida, precisa y con el menor coste posible. Si bien la limpieza y desinfección es una etapa primordial para alcanzar alimentos inocuos y salubres (Wildbrett, 2000), su vigilancia y control mediante técnicas tradicionales y/o rápidas se convierte en la única vía para verificar su eficacia y asegurar las condiciones higiénico sanitarias adecuadas para el procesado y manipulación de productos alimenticios (Orihuel y Berto, 1996).

La utilidad de los métodos de control de higiene de superficies debe considerarse como un eslabón crucial para la identificación tanto de microorganismos banales como patógenos. El

desarrollo de nuevos métodos cuya ventaja principal respecto a los métodos convencionales es la rapidez en la obtención de datos, se ajusta perfectamente a las necesidades reales de la industria de hoy en día. El objetivo buscado en un método para ser empleado en una empresa se debería centrar en dos puntos: especificidad en la detección y reducción del tiempo de análisis. En particular, las técnicas basadas en la detección de microorganismos a tiempo real deberían ayudar al sector a comprender mejor la ecología de las comunidades microbianas complejas utilizando el mínimo de muestras (Bagge-Ravn y cols., 2003b). Es importante reseñar que en la actualidad no existen protocolos rápidos, lo suficientemente eficaces, para poner de manifiesto la presencia de microorganismos, su adhesión y su posible multiplicación en las superficies de trabajo de forma rutinaria, así como poner de manifiesto la eficacia real del desinfectante aplicado.

No obstante, a pesar de que estas técnicas convencionales poseen algunas limitaciones, actualmente siguen siendo técnicas aceptadas y de uso común para la detección de bacterias en superficies de contacto. Por lo tanto, es necesario seguir trabajando en la mejora de éstas técnicas para optimizar los protocolos de recuperación de microorganismos en superficies (Moore y Griffith, 2002b).

Un sector en el que es importante controlar las contaminaciones cruzadas es el de los mataderos. Este objetivo se puede conseguir aplicando métodos de descontaminación directa bien sobre la piel de los animales o bien sobre las canales (Sofos y Smith, 1998). Así, algunos autores han sugerido que el duchado con agua y sustancias antimicrobianas conseguiría reducir la contaminación microbiana de las superficies externas de los animales (Sofos, 2002; Bosilevac y cols., 2004). Por lo que en Estados Unidos, la descontaminación de la superficie de la piel de animales vivos antes del sacrificio se ha sugerido como medida de control y prevención de la contaminación cruzada durante el procesado especialmente para reducir y/o eliminar la presencia de microorganismos patógenos como *E. coli* O157:H7.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Los objetivos generales y específicos planteados en esta Tesis doctoral fueron:

1. Puesta a punto y aplicación de la técnica de microscopia de epifluorescencia (DEM) en el control microbiológico de superficies de acero inoxidable. Para lo cual se debió:
 - Validar la técnica DEM con el método tradicional de recuento en placa.
 - Evaluar el efecto de distintas condiciones ambientales sobre el crecimiento y supervivencia de *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* inoculados en superficies de acero inoxidable durante 3 días, mediante DEM y recuento en placa.
2. Optimización y comparación de los métodos tradicionales y rápidos para valorar la higiene de las superficies en condiciones de estudio en el laboratorio. Para lo cual se debió:
 - Optimizar la técnica tradicional de escobillado con el fin de mejorar la eficacia de recuperación de los microorganismos adheridos a las superficies.
 - Valorar la eficacia y la utilidad real del DEM, la bioluminiscencia y la impedancia como métodos rápidos y alternativos a la técnica de escobillado y al recuento en placa.
3. Aplicación y comparación de métodos rápidos y tradicionales, para la verificación de la eficacia del programa de higienización de una industria alimentaria. Para lo cual se debió:
 - Evaluar *in situ* las condiciones higiénicas de las superficies mediante la técnica DEM, incluyendo la determinación de la posible presencia de biofilms o células viables no cultivables tras la higienización.

- Evaluar el grado de eficacia de la limpieza y desinfección mediante la técnica tradicional de escobillado y recuento en placa, la técnica de impedancia y la técnica rápida de detección de ATP por bioluminiscencia.
 - Establecer un límite de aceptación y/o rechazo en relación al recuento microbiano y al valor de ATP para la vigilancia y control de la higiene de superficies de la empresa evaluada. Así como establecer un límite crítico para la técnica de impedancia en base al valor del método tradicional de recuento.
 - Identificar la microbiota persistente tras la limpieza y desinfección.
4. Evaluación del grado de descontaminación de piel de vacuno inoculada con *E. coli* O157: H7. Para lo cual se debió:
- Evaluar la eficacia del Tween 20 combinado con ácido láctico y/o hidróxido sódico aplicados a distintas concentraciones y diferentes tiempos de contacto para la descontaminación de piel de vacuno inoculada con *E. coli* O157: H7.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Contaminación microbiana de los alimentos

Una de las causas más importantes de la presencia de peligros biológicos en los alimentos son las contaminaciones cruzadas. Un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud, en el ámbito europeo, determinó que el 25% de los brotes de toxiinfección alimentaria fueron asociados a contaminaciones cruzadas. Concretamente, los factores que contribuyeron a la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos eran debidos a prácticas higiénicas ineficientes (1,6%), contaminación cruzada (3,6%), proceso o almacenaje en instalaciones inadecuadas (4,2%), superficies contaminadas (5,7%) y contaminación del personal (WHO (World Health Organisation), 1995).

Por contaminación cruzada se entiende la transmisión de microorganismos de un alimento a otro de forma directa o indirecta. Y adquiere su máximo riesgo cuando se produce desde alimentos crudos a alimentos elaborados. En éste caso los posibles patógenos se encuentran con muy pocas barreras y pueden multiplicarse siempre y cuando se den las condiciones adecuadas (Reij y Den Aantrekker, 2004).

Las materias primas o ingredientes contaminados que se añaden al producto acabado se han identificado como una vía de contaminación de patógenos en numerosos brotes de toxinfeción alimentaria como el caso del cacao en polvo usado para preparar los productos a partir chocolate (*Salmonella*; Gästrin y cols., 1972 citado por Reij y Den Aantrekker, 2004), la paprika utilizada para aderezar las patata *chips* (*Salmonella*; Lehmacher y cols., 1995 citado por Reij y Den Aantrekker, 2004), el jarabe del chocolate utilizado para preparar los batidos de chocolate caliente (*Yersinia enterocolitica*; Black y cols., 1978 citado por Reij y Den Aantrekker, 2004).

Las superficies son una de las vía de contaminación de alimentos más frecuentes tanto en la industria alimentaria, en la restauración colectiva así como en el hogar (Kusumaningrum y cols., 2003). Las bacterias que colonizan las superficies pueden actuar como un reservorio de microorganismos alterantes, como *Pseudomonas aeruginosa* (Bagge-Ravn y cols., 2003a) y/o patógenos como por ejemplo *S. aureus* o *L. monocytogenes* (Reij y Den Aantrekker, 2004).

Estos a su vez, pueden contaminar productos alimenticios directamente a través del ambiente del área de procesado e incluso por contacto si han podido sobrevivir, inclusive, tras la limpieza y desinfección (Frank y Koffi, 1990; Reij y Den Aantrekker, 2004).

Hoy en día la vigilancia y control de la contaminación microbiana de las superficies está adquiriendo un interés creciente debido en parte a la notificación de brotes alimentarios cuyas vías de contaminación implicadas han sido superficies, equipos y/o utensilios de contacto con el alimento contaminado (**Tabla 1**).

Tabla 1. Brotes alimentarios producidos por contaminación cruzada de superficies.

Patógeno	Alimento implicado	Vía de contaminación	Referencia
<i>E. coli</i> O157:H7	Carne picada	Cortadora de utensilios supermercado	Banatvala y cols. (1996)
<i>L. monocytogenes</i>	Mantequilla	Ambiente procesado	Lyytikainen y cols. (2000)
<i>L. monocytogenes</i>	Salchichas	Máquina de llenado y envasado	Goulet y cols. (1998)
<i>Salmonella agona</i>	Cereales desayuno	Equipo y líneas de procesado	Breuer (1999)
<i>Salmonella enteritidis</i>	Helado	Tanque de transporte y almacenado	Hennessy y cols. (1996)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Leche pasteurizada	Contaminación ambiental post-procesado	Ackers y cols. (2000)

Fuente: Reij y Den Aantrekker, (2004)

2. Limpieza y desinfección

La limpieza es el conjunto de operaciones que permiten eliminar la suciedad visible o microscópica. Estas operaciones se realizan mediante productos detergentes elegidos en función del tipo de suciedad y de las superficies donde se asienta. Los agentes limpiadores generalmente incluyen componentes que mojan y penetran en la suciedad, lo que facilita su movilización (Wildbrett, 2000).

La desinfección es el conjunto de operaciones que tienen como objetivo la reducción temporal del número de microorganismos vivos y la destrucción de los microorganismos patógenos y alterantes (Holah, 1995a).

Las palabras limpieza y desinfección, en su conjunto, son sinónimas de la palabra higienización. Se entiende por higienización, el tratamiento que reduce la población microbiana a niveles que se juzgan no perjudiciales para la salud pública. Su diferencia con la desinfección es que la higienización implica una acción de limpieza, cosa que no es imprescindible en la desinfección (García, 1988).

Los conceptos de limpieza y desinfección son difícilmente separables entre sí. La eliminación de la suciedad como objetivo de la limpieza significa a la vez la destrucción de la fracción principal los gérmenes presentes. Por otra parte, las soluciones desinfectantes provocan en discreta medida el traslado de suciedades, en las que pueden encontrarse microorganismos vivos. La principal misión de la desinfección, la destrucción de gérmenes, tampoco es exclusiva de los agentes desinfectantes. Las operaciones de limpieza, sobretodo las que se realizan a pH y temperaturas elevadas, tienen actividad bactericida (Wildbrett, 2000).

2.1. Aplicación del programa de limpieza y desinfección

Según Socías (1992), la higiene debe contemplarse dentro de una perspectiva global como una etapa básica del proceso productivo, considerada como un requisito previo del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC). En un plan de higienización se tiene que evaluar las necesidades higiénicas de cada zona y establecer un programa de limpieza y desinfección eficaz según los requerimientos de cada etapa de producción de los

alimentos (desde la materia prima hasta su consumo). Por lo tanto en la industria alimentaria es esencial el estado de limpieza física, química y microbiológica de las líneas. La selección de detergentes y desinfectantes en la industria alimentaria depende de la eficacia, seguridad y capacidad de aclarado del agente, así como de si es corrosivo o afecta a los parámetros sensoriales del producto (Wirtanen y Salo, 2003). Para realizar una buena limpieza y desinfección se debe realizar un estudio previo analizando los siguientes parámetros (Wildbrett, 2000):

- Suciedad: clase, estado y cantidad.
- Objeto a limpiar: forma, material y rugosidad.
- Etapas a realizar: preenjuague, limpieza con detergente, enjuague, desinfección con desinfectante, enjuague y secado.
- Productos a emplear: tipo, modo de aplicación, temperatura, tiempo de contacto y dosificación.
- Periodicidad de la limpieza y desinfección.

Los productos de limpieza se eligen en función de la naturaleza y el estado de superficies y de la suciedad que se debe eliminar. Los residuos se pueden caracterizar por su composición química (Holah, 1995a). Además, según Troller (1993) el conocimiento de las propiedades físico-químicas de la suciedad, así como del crecimiento microbiano desarrollado en las superficies y equipos de procesado, permite definir las características que son necesarias en el producto de limpieza. Entre las características más importantes que debe tener un producto de limpieza son:

- Poder dispersante: capacidad de desagregar las partículas de suciedad y mantenerlas en suspensión.
- Poder quelante: capacidad de acomplejar los minerales e impedir así que cristalicen, precipiten o se incrusten en los materiales con los que contactan.

- Poder desgrasante: capacidad para dispersar y emulsionar grasas.

2.2. Etapas de la limpieza y desinfección

La aplicación de las distintas etapas depende de (Wildbrett, 2000):

1. *Preenjuague*: se trata de realizar una limpieza previa con agua, para eliminar la suciedad más grosera. Se evitará realizar esta operación mediante sistemas de alta presión ya que pueden proyectar partículas de suciedad hacia otras zonas.
2. *Aplicación del detergente*: se realizará mediante el sistema adecuado en cada caso particular. Esta fase es la responsable de disolver y solubilizar la suciedad.
3. *Enjuague*: se realizará mediante agua potable abundante, a media-baja presión para evitar aerosoles.
4. *Aplicación del desinfectante*: una vez realizado el proceso de limpieza como tal, se procede a aplicar un desinfectante, para destruir los microorganismos que no se hayan eliminado en el proceso de limpieza, en la fase de aclarado.
5. *Enjuague*: posteriormente se enjuagará, para evitar que los residuos de desinfectante contaminen a los alimentos.
6. *Secado*: en la medida de las posibilidades se realizará una etapa de secado, porque el agua, además de favorecer el crecimiento bacteriano, puede hacer de vehículo diseminador si hubiese quedado algún microorganismo.

2.3. Desinfección

Históricamente, los desinfectantes han sido utilizados con éxito en el control y prevención de la salud. Después de que se desarrollaron las técnicas para aislar y replicar los microorganismos, fue posible efectuar las pruebas para verificar la eficacia de los

desinfectantes y se vio que los principios activos que inactivaban a los microorganismos en placa, no eran igualmente eficaces en presencia de materia orgánica o en función del tipo de material a desinfectar. En cualquier caso, es evidente que la limpieza y desinfección de las superficies en la industria alimentaria disminuye los peligros alimentarios y los riesgos que se puedan generar (Holah, 1995b).

La limpieza y desinfección mantiene la calidad y garantiza la seguridad durante el proceso en la manipulación de los alimentos (Holah y Thorpe, 1990). Este proceso de higienización requiere que la primera etapa a realizar sea una adecuada limpieza de todas las superficies para eliminar las sustancias que podrían interferir en la acción del desinfectante (Holah, 1995a).

2.3.1. Requisitos que debe cumplir un buen desinfectante

Un buen desinfectante debe cumplir las siguientes propiedades (García, 1989):

1. No debe producir olor/sabor/color extraños al ser absorbido o reaccionar con el alimento.
2. No debe ser tóxico a las dosis de empleo.
3. No ejercer una acción perjudicial sobre las superficies a tratar.
4. Ser efectivo en las condiciones de temperatura, tiempo de contacto, pH y grado de contaminación en que debe ser utilizado.
5. Debe ser estable y fácilmente soluble en el agua.
6. Baja relación coste/eficacia.
7. Ser eficaz sobre el espectro de microorganismos a tratar.

8. Ser eficaz en cualquiera que sea la calidad del agua empleada e incluso en presencia de materia orgánica.
9. Conseguir la destrucción de gérmenes en un corto espacio de tiempo.

2.3.2. Principales familias de desinfectantes

Las principales familias de desinfectantes son (McDonell y Rusell, 1999):

1. *Productos oxidantes*: como por ejemplo, los halogenados, bien sean el cloro y derivados, o el yodo y derivados (denominados yodóforos), son parte de los más usados en la actualidad, generalmente como desinfectantes de superficies los primeros y como antisépticos de piel y mucosas los segundos, aunque tanto unos como otros pueden tener efectos tóxicos. Dentro de este grupo también están peróxido de hidrógeno y el ácido peroxiacético.
2. *Productos reductores*: como el glutaraldehído, que sigue siendo el desinfectante de referencia para la desinfección de instrumental, aunque con las micobacterias hay que aplicarlo durante mucho tiempo y, además, tiene efectos tóxicos e irritantes, por lo que hay que reducir los niveles de este producto.
3. *Alcoholes*: son muy activos sobre microorganismos con capa lipídica y se mezclan muy bien con otros productos de amplio espectro.
4. *Fenoles*: usados para desinfección de superficies.
5. *Productos basados en tensoactivos*: que según su carga iónica se clasifican en catiónicos (los más eficaces, como los amonios cuaternarios), aniónicos (con gran efecto detergente como los jabones habituales) y anfóteros, con propiedades intermedias entre los anteriores.
6. *Derivados minerales*: poco usados en la actualidad, excepto los derivados de plata.

Las propiedades, tanto físicas como químicas de los desinfectantes pueden limitar su elección para una aplicación en particular. No sería adecuado, por ejemplo, utilizar hidróxido sódico en superficies que contuvieran estaño, zinc o aluminio, ya que la solución corroería los materiales. Tampoco sería adecuado usar ácido clorhídrico en acero o hierro por los mismos motivos. No se deben utilizar agentes oxidantes en presencia de sustancias reductoras ya que neutralizarían su efecto. Algunas actividades frente a superficies pueden resultar interesantes en algunos casos, pero no en otros. Las propiedades adicionales (manchar, toxicidad, etc.) también se deben tener en cuenta ya que pueden convertir el producto en inadecuado (Jeffrey, 1995).

Los desinfectantes modernos son complejas formulaciones de sustancias químicas, jabones, detergentes y componentes que ayudan a la penetración de los principios activos (Kahrs, 1995). En la Unión Europea, existen aproximadamente 250 sustancias que se utilizan como productos antimicrobianos. Aproximadamente 100 de esas sustancias son usadas comúnmente como productos desinfectantes (Jeffrey, 1995).

2.3.3. Mecanismo de acción de los desinfectantes

Para la deseada reacción entre el desinfectante y los gérmenes a combatir, es un requisito importante el contacto entre ambos, lo que permite que tenga lugar el proceso de la destrucción. Se pueden distinguir dos fases, que discurren consecutivamente (Herruzo, 2000).

1. *Primera fase:* debe asegurarse el contacto directo de la solución desinfectante con los microorganismos. A diferencia de la desinfección térmica, en la que puede alcanzarse la acción desinfectante por transmisión del calor, sin contacto inmediato con el medio que aporta el calor, la desinfección química no puede llevarse a efecto si no existe contacto de los microorganismos con el producto desinfectante. La finalidad de las operaciones de limpieza es hacer a los productos desinfectantes accesibles a los gérmenes.
2. *Segunda fase:* el proceso de interacción y/o penetración del desinfectante con el microorganismo. En ella, las moléculas del principio activo deben tener acceso a los componentes celulares “vitales” de los gérmenes. El contacto exterior comienza con

una adsorción y adhesión, favorecida en parte por cargas eléctricas de signo contrario, y en parte por grupos moleculares o grupos marginales complementarios (Maris, 1995)

2.3.4. Factores que afectan la acción de los desinfectantes

Los factores que influyen en la desinfección son (Herruzo, 2000):

1. *Tipo de microorganismos*: las formas más resistentes son las esporas bacterianas y fungicas. Les siguen los hongos, los cocos Gram positivos, los bacilos Gram positivos, y los bacilos Gram negativos (excepto *Pseudomonas* que es especialmente resistente a los amonios cuaternarios). Los virus grandes con cobertura lipídica son más sensibles que los sin cobertura.
2. *Número de microorganismos*: Si la carga microbiana es elevada, se necesita una cantidad superior de desinfectante o un tiempo superior de exposición para conseguir un determinado nivel de desinfección. De ahí la necesidad de limpiar, previamente a la aplicación del desinfectante, pues se reducirá la carga microbiana y se eliminará materia orgánica, que no sólo protege a los microorganismos sino que también puede inactivar al desinfectante.
3. *Tiempo de actuación y concentración del producto*: generalmente al aumentar el tiempo de contacto, aumenta la tasa de letalidad. El tiempo de contacto es uno de los factores críticos para asegurar la desinfección. Por lo general para determinar la letalidad bacteriana a los desinfectantes el tiempo de elección utilizado experimentalmente es de 5 minutos (Holah, 1995b).
4. *Materia orgánica*: Interfiere la acción del desinfectante básicamente por dos razones, debido a que la materia orgánica inactiva ciertos desinfectantes, como por ejemplo el hipoclorito sódico. Por ello hay que limpiar previamente a la desinfección. Además, de una forma no reactiva, la materia orgánica e inorgánica forman una barrera protectora, de tal manera, que los microorganismos son protegidos de sus efectos (Holah, 1995b).

5. *Otras sustancias:* Jabones y detergentes, corcho, algodón, goma, etc. Pueden reaccionar con el desinfectante neutralizándolo.
6. *Superficie de actuación:* La principal limitación de los sistemas de limpieza reside en los problemas de acceso a zonas con ranuras, grietas, puntos ciegos, manchas de corrosión. Las irregularidades de las superficies permitirán el alojamiento de microorganismos y de materia orgánica y, por lo tanto han de limpiarse a fondo, pero se deberá guardar un cierto equilibrio entre la intensidad de la limpieza y el mantenimiento de los instrumentos (Troller, 1993).

Frank y Chmielewski (2001) sugirieron que el diseño higiénico de las superficies y equipos de procesamiento debería estar basado en una sólida combinación de ingeniería mecánica y de proceso, así como de conocimientos microbiológicos. Los requisitos higiénicos se deberían adoptar en la fase inicial de desarrollo de los equipos y de los componentes porque actualizar o modificar los diseños existentes resulta frecuentemente caro y falto de éxito. Fønnesbech y cols. (2001) demostraron que al realizar modificaciones del diseño del equipo y el mantenimiento apropiado en una sala de despiece de carne y en una industria de salmón ahumado decreció la incidencia de *Listeria monocytogenes*.

Por otro lado, la elección de materiales y el tratamiento que se realice sobre los mismos con el fin de retener el menor número de bacterias después de la limpieza y la desinfección es crucial con el fin de garantizar la higiene de las superficies y evitar así la contaminación cruzada (Frank y Chmielewski, 2001). El acero inoxidable es el material más utilizado en la industria alimentaria para el contacto con los alimentos ya que es un material estable, inerte, y puede ser tratado fácilmente para obtener superficies fáciles de limpiar, al igual que la cerámica para los suelos. Además, el acero inoxidable puede tener diferentes tipos de acabado que le confieren distintas propiedades fisicoquímicas, electroquímicas, rugosidad y composición molecular de la superficie (Boulangé-Peterman, 1997).

Algunos autores, demostraron que cuando se desinfectan superficies de acero inoxidable o vidrio, la concentración de compuestos de amonio cuaternario, glutaraldehído, hipoclorito sódico o yodóforos requeridos es entre diez y cien veces

inferior que la necesaria para desinfectar otras superficies como el plástico (polipropileno, poliuretano o poliéster) y el aluminio (Frank y cols., 1997).

7. *Temperatura*: Los efectos químicos de limpieza y desinfección se incrementan linealmente con la temperatura y aproximadamente se duplica por cada aumento de 10° C, siendo esta eficacia proporcional hasta alcanzar temperaturas a las que se induce la muerte celular (Holah, 1995b). Taylor y cols. (1999) observaron que tras probar diferentes desinfectantes frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* O157:H7, a 10°C y 20°C, una mayor proporción de desinfectantes eran más eficaces a la temperatura superior.

8. *Biofilms*: los microorganismos cuando colonizan una superficie y se adhieren a ella comienzan a multiplicarse y organizarse en comunidades denominadas biofilms. Los biofilms poseen una mayor resistencia a los desinfectantes debido a que se encuentran embebidas en una matriz de exopolisacáridos que les confiere estabilidad, nutrición y resistencia frente a las sustancias antimicrobianas (Costerton y cols., 1995). Debido a la importancia que tienen en el marco de la seguridad alimentaria, los biofilms se tratarán en un capítulo aparte de esta revisión.

2.3.4.1. El secado de las superficies como medida de prevención

El proceso de secado se cree que es de importancia crítica para maximizar la reducción de las bacterias (Montville y cols., 2002). Varios estudios, han demostrado que el secado de superficies tiene un importante efecto bactericida, aunque la efectividad del proceso depende de la naturaleza del organismo y estado que se encuentra, el tiempo de secado, así como de las condiciones de temperatura, suciedad y humedad (McEldowney y Fletcher, 1988; Hirai, 1991). Un ejemplo de ello es *Staphylococcus aureus*, ya que tiene tendencia a formar agregados que pueden proporcionar protección frente a la deshidratación y la limpieza a las células más internas (Tebbutt, 1991). Posiblemente debido a esta estructura grupal, 15 minutos de aire secante no reducen significativamente los recuentos de *S. aureus* de las superficies, lo que corrobora su tolerancia frente a las condiciones secas (Kusumaningrum y cols., 2003). De este modo, aunque el secado es un proceso importante para mantener las

superficies en un estado higiénico, no puede ser considerado como un proceso para alcanzar la desinfección *per se* (Anónimo, 2002)

Es igualmente importante la persistencia de otros microorganismos patógenos. Así, Cogan y cols. (1999) observaron que la supervivencia de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. era de más de 3 horas tanto en las superficies de la cocina doméstica como en las manos, después de la preparación de pollo fresco contaminado. Por otra parte, Humphrey y cols. (1994) observaron que tras batir huevos contaminados artificialmente, la supervivencia de *S. enteritidis* en superficies de formica era de 24 horas.

2.3.4.2. Valoración de la eficacia de los desinfectantes

La creación de un mercado único europeo ha proporcionado incentivos para la revisión de la metodología en la evaluación de la eficacia de los desinfectantes y la estandarización europea de los métodos de ensayo. Debido a que la unificación de los ensayos de desinfección es una prioridad para la industria europea, algunos Institutos Europeos de Estandarización pidieron al Comité Europeo de Normalización (CEN) que se desarrollaran estándares europeos. Dicha petición progresó gracias a la formación en 1989 de la CEN/TC 216, un nuevo comité técnico, “químicos, desinfectantes y antisépticos”, que fue establecido para armonizar los métodos de ensayo de desinfectantes (Gibson y cols., 1995). El comité europeo CEN TC 216 desarrolló un ensayo de suspensión (Anónimo, 1997a; Anónimo, 1997b) y sobre superficies (Anónimo, 1998a; Anónimo, 1998b) simulando condiciones prácticas de uso, específicamente para alimentos, industrias y ámbito doméstico. La actividad bactericida de un agente antimicrobiano se determina por su capacidad de eliminar un determinado número de microorganismos en un período de tiempo establecido. Pasado este tiempo, el medio de cultivo con el neutralizador es usado para inactivar el efecto residual que pudiera tener el agente sobre las células supervivientes. Sin un neutralizador presente en el medio de cultivo, el agente antimicrobiano puede inhibir el crecimiento de microorganismos viables (Gibson y cols., 1995).

Para desinfectantes y antisépticos comerciales, existen una gran cantidad de ensayos de laboratorios para asegurar una mínima actividad antimicrobiana. Para recomendar un desinfectante o antiséptico para un determinado uso, los productos deben ser sometidos a una

prueba posterior siguiendo la norma mencionada anteriormente que se hace en la fase 2 (ensayos realizados en condiciones sucias) y que corresponde a pruebas de suspensión y en superficie. Estas pruebas se formulan de acuerdo al área al que se vaya a destinar el producto. Las pruebas de suspensión deben seguir los procedimientos de la fase 1 (ensayos realizados en condiciones limpias), pero deben incluir nuevas cepas, productos diluyentes (agua de una dureza estandarizada), sólidos orgánicos (1% peso / volumen), tiempos de contacto (5, 30, 60 minutos) y temperaturas apropiadas para el uso (Bloomfield y cols., 1991).

Las pruebas de eficacia desinfectante en suspensión descritas en la norma mencionada anteriormente indican que un desinfectante es eficaz si consigue reducir 5 unidades logarítmicas lo cual se aleja bastante de las condiciones reales de crecimiento de los microorganismos en superficie, donde los desinfectantes deben actuar para inactivar a los microbios (Wirtanen y Salo, 2003). Las pruebas de suspensión estándares son suficientemente reproducibles porque las variaciones de resultados están dentro de límites aceptables cuando se realizan replicados adecuados. Sin embargo cuando dichos ensayos de suspensión se realizan en presencia de materia orgánica, los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad se ven alterados. Es obvio que las pruebas en superficie son aún más difíciles de realizar que las pruebas de suspensión, debido al tipo de soporte utilizado para realizar el ensayo y también debido al comportamiento vital de una bacteria en una superficie seca (Bloomfield y cols., 1991). Para desarrollar un protocolo estandarizado de evaluación de eficacia desinfectante en superficies sólidas es importante identificar las fuentes principales de la variación en el procedimiento. Es importante también tener en cuenta que la susceptibilidad a los desinfectantes varía considerablemente cuando los microorganismos están dentro de un biofilm o si están desecados en una superficie, respecto a si se encuentran libres en una suspensión. Mattila-Sandholm y Wirtanen (1992) observaron que los desinfectantes debían ser utilizados a concentraciones más altas en superficies que en suspensiones puesto que la eficacia de un desinfectante dependía en parte de la capacidad de penetración del mismo en una superficie. El Comité Europeo de Normalización CEN/TC 216 para resolver este problema desarrolló una nueva norma adoptada en España como UNE-EN 13697: Ensayo cuantitativo de superficie no porosa para la evaluación de la actividad bactericida y/o fúngica de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo sin acción mecánica y requisitos (fase 2/estapa2). En este caso, un desinfectante se considera eficaz si es capaz de reducir 4 unidades logarítmicas en 5 minutos (Anónimo, 2002).

2.3.5. Resistencias a los desinfectantes

Cuando se produce un fracaso en la desinfección, es decir, el desinfectante no es capaz de eliminar una cantidad de bacterias esperada, probablemente sea consecuencia de las malas condiciones de uso del desinfectante (concentración inadecuada, temperatura, tiempo de contacto), o bien porque se produce una mala limpieza dejando restos de suciedad en las superficies que posteriormente se desinfectaran (Holah, 1995a). Ocasionalmente, los usuarios suelen tener unas expectativas poco realistas del espectro de actividad de los desinfectantes aplicados. Muchos desinfectantes que se emplean en la industria no matan las esporas y por lo tanto el proceso de desinfección se convierte en un proceso de selección de microorganismos (Bredholt y cols., 1999). En algunos casos las bacterias sobreviven tras una limpieza y desinfección aparentemente efectiva. Una explicación de ello podría ser que la susceptibilidad de las bacterias presentes en las instalaciones sea más baja de la esperada debido a su estado (tasa de crecimiento, estado nutricional, adhesión a la superficie) o de su resistencia. Diariamente gran cantidad de microorganismos procedentes de la materia prima, ambiente, agua y suciedad se introducen en las instalaciones de procesado de alimentos. Sin embargo la diversidad de bacterias evaluadas en las pruebas de eficacia desinfectante es limitada y las recomendaciones de uso de los desinfectantes están basadas en ensayos de suspensión del laboratorio con distintas cepas patrón. Formular rutinas de desinfección ineficientes puede producir también la selección de microorganismos que en teoría se deberían eliminar con el desinfectante aplicado. Si el aclarado del desinfectante es insuficiente, puede quedar una concentración residual del desinfectante que cause un efecto subletal sobre las bacterias que podría conducir a una presión selectiva para retener o adquirir una resistencia genética entre microorganismos o la adaptación de una bacteria inicialmente sensible (Langsrud y cols., 2003).

Los microorganismos patógenos resistentes que sobreviven al proceso de desinfección y contaminan los alimentos representan una amenaza para la industria alimentaria y el consumidor (Bloomfield y cols., 1991; Langsrud y cols., 2003). La resistencia combinada a los desinfectantes y otros tipos de agentes antibacterianos pueden convertirse en un problema para la industria en el futuro. Una definición práctica de resistencia sería igual a supervivencia. No obstante en términos adecuados a las sustancias antibacterianas, se considera que si un microorganismo sobrevive o crece en concentraciones de desinfectante más altas que otro microorganismo se considera que el primero tiene mayor resistencia. Y si

una cepa que pertenece a una especie determinada sobrevive a concentraciones de un desinfectante que mata a la mayoría de las otras cepas de la misma especie se definen como más resistentes (Langsrud y cols., 2003).

Se ha demostrado que las bacterias aisladas de una solución desinfectante o de un equipo de desinfección pueden perder su resistencia rápidamente en condiciones de laboratorio y pueden no sobrevivir a los ensayos de eficacia desinfectante (Gibson y cols., 1999). Una explicación de este fenómeno se debe a que en condiciones naturales los microorganismos se desarrollan en superficies, mientras que las bacterias de ensayos proceden de cultivos en medios nutritivos. Otro motivo descrito por varios autores, es que los microorganismos adheridos a las superficies son más resistentes a un amplio espectro de sustancias antibacterianas, incluso los desinfectantes. Debido a que, tras la adhesión, los microorganismos empiezan a sintetizar un matriz de exopolisacáridos que les protege de los desinfectantes (Chmielewski y Frank, 2003). Otros factores que también pueden contribuir a la resistencia de las células son la menor tasa de multiplicación, la disponibilidad limitada de nutrientes y el incremento de producción de enzimas que degradan los desinfectantes (Boulangé-Peterman, 1996). En condiciones reales, las superficies se limpian antes de desinfectarse y la exposición de las bacterias a los agentes limpiadores pueden reducir la resistencia de los microorganismos al desinfectante aplicado (Holah y cols., 1998). Por lo tanto la supervivencia de microorganismos en condiciones reales no es solo resultado de su resistencia sino que intervienen otros factores como la capacidad de adherirse a una superficies, las condiciones de crecimientos y los factores que causen estrés (Langsrud y cols., 2003).

2.3.5.1. Incidencia de cepas resistentes en la industria alimentaria

La presencia de cepas resistentes a los desinfectantes aplicados puede representar un desafío económico para la industria alimentaria además de tener implicaciones en la salud humana. Sundheim y cols. (1992) demostraron la resistencia de algunas cepas de *Staphylococcus* hacia los amonios cuaternarios, concretamente que más del 13% de las cepas eran resistentes al cloruro de benzalconio. En otro estudio realizado con *Listeria monocytogenes* aislada de una industria alimentaria observaron que el 4% de las cepas aisladas eran tolerantes a la concentración mínima inhibitoria (MIC 3 μgml^{-1}) y un 13% eran resistentes (MIC 4-7 $\mu\text{g/ml}$) a los amonios cuaternarios (Aase y cols., 2000).

Pseudomonas spp. a menudo se encuentra en las superficies y equipos de la industria alimentaria. Se considera una importante bacteria alterante de los alimentos (Wirtanen y cols., 2001b). Su persistencia al medio se puede explicar por su capacidad de formar biofilms y su elevada resistencia intrínseca hacia los desinfectantes. La resistencia de las Enterobacterias a los desinfectantes generalmente es menor que la de *Pseudomonas* spp. (Russell y Chopra, 1996).

Algunos autores, observaron como las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de la superficie de un equipo mostraban más resistencia a los productos clorados que las aisladas en piel de pavos sacrificados. Estos autores sugirieron que el resultado de aislar cepas más resistentes en la superficie fue gracias a la selección de cepas que desarrollaron la capacidad de adherirse a la superficie y producir limo (Langsrud y cols., 2003).

El uso de desinfectantes puede conducir a la selección de cepas bacterianas que son intrínsecamente resistentes a los agentes antibacterianos aplicados. Además la exposición a desinfectantes en concentraciones subletales produce una resistencia más estable. Es importante diferenciar una respuesta inducida por un estrés, la cual es reversible de la adaptación que produce una resistencia más estable a los desinfectantes.

En condiciones de laboratorio la adaptación de los microorganismos se estudia mediante la exposición de los mismos a concentraciones de desinfectantes gradualmente más altas. En condiciones reales la adaptación ocurre en los nichos de difícil acceso en los cuales el desinfectante queda en bajas concentraciones (Langsrud y cols., 2003).

En resumen las bacterias pueden adquirir resistencia más alta a los desinfectantes a través de la adaptación, adquisición de elementos resistentes a nivel genético, respuestas de estrés o formación de biofilms (Langsrud y cols., 2003).

Para evitar la aparición de las resistencias es necesario aplicar los principios básicos y elementales de la higiene entre ellos: realizar una buena limpieza antes de la desinfección, utilizar la concentración y el tiempo de contacto adecuados y finalmente aclarar y secar las superficies tras la desinfección que en muchos caso puede prevenir la aparición de resistencias bacterianas (Wildbrett, 2000). Una posible solución a los fenómenos de resistencia es la rotación entre distintos desinfectantes que no estén relacionados o la aplicación de

concentraciones del desinfectante más altas. En esencia, esta práctica conlleva que, cada cierto tiempo, dependiendo del tipo de contaminación y la extensión de la misma, se cambia el tipo de desinfectante creando un ciclo con dos, y preferiblemente con tres, productos de desinfección diferentes (Langsrud y cols., 2003).

2.3.6. Biofilms

En los últimos veinte años, ha ido creciendo la percepción de que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en una forma unicelular, planctónica o libre, como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría se combinan en grandes colonias limosas donde los diversos microorganismos establecen relaciones y dependencias. Esta percepción ha constituido un punto de partida para incitar a investigar más acerca de las propiedades físicas y químicas de los biofilms, la caracterización de su morfología, y sus formas de desarrollo (Frank y cols., 1997).

Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos embebidas en una matriz de polímeros extracelulares, fijas a una superficie, que pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes. Se pueden encontrar biofilms en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Necesitan un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, porque pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas (Carpentier y Cerf, 1993; Costerton y cols., 1995; Chmielewski y Frank, 2003).

Desde un punto de vista tecnológico, algunos biofilms pueden desempeñar una función beneficiosa cuando forman parte de biorreactores para la obtención de productos fermentados. Sin embargo, su presencia puede ser perjudicial e indeseable puesto que en muchos casos producen contaminaciones del producto acabado, que se traduce en una disminución del periodo de conservación y/o en la transmisión potencial de enfermedades (Carpentier y Cerf, 1993; Sharma y Anand, 2002). Además, según Sharma y Anand (2002) son peligrosos desde el punto de vista tecnológico puesto que producen una reducción del flujo, de la transmisión del calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de las membranas y corrosión de metales.

2.3.6.1. Fases de desarrollo del biofilm

Las principales fases de desarrollo se muestran en la **Figura 1** y se describen a continuación:

1. *Acondicionamiento*: el biofilm bacteriano empieza a formarse cuando alguna célula individual se adhiere inicialmente a una superficie. La capacidad de adhesión de los microorganismos a un sustrato depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas (Costerton y cols., 1995; Chmielewski y Frank, 2003).
2. *Adsorción y fijación*: el proceso de adhesión se da en dos fases; una primera fase reversible, seguida de una segunda fase irreversible. La fase reversible es una unión débil de la bacteria con el sustrato. En ella actúan fuerzas de *Van der Waals* y fuerzas electrostáticas e interacciones hidrófobas. Durante la unión reversible, las bacterias siguen mostrando movimientos brownianos y se pueden eliminar de manera sencilla con una suave limpieza (Mittelman, 1998; Chmielewski y Frank, 2003)

La segunda fase, irreversible, es dependiente del tiempo, resulta del anclaje de los apéndices celulares y/o de la producción de polímeros extracelulares. En esta fase las bacterias sintetizan la matriz de exopolisacáridos para establecer un contacto físico entre las células y la superficie. Una vez se ha establecido, las células bacterianas se multiplican dando lugar a microcolonias y posteriormente el biofilm. Durante el proceso de adhesión, las bacterias cambian su fenotipo y llegan a ser básicamente diferentes respecto a cuando están en forma libre, estado conocido con el nombre de *planktonic cells*. De modo que se produce la expresión de genes específicos, se producen cambios y alteraciones en su morfología y cambian su tasa de crecimiento (Chmielewski y Frank, 2003).

Teniendo en cuenta este proceso, la matriz de exopolisacáridos es uno de los componentes principales que interviene en el mecanismo de adhesión de los microorganismos. Concretamente, Herald y Zottola (1988) fueron de los primeros investigadores que estudiaron la adhesión de las bacterias en superficies de acero inoxidable en contacto con alimentos, observando la formación de gran cantidad de

exopolisacáridos producidos por los microorganismos. Por ello, las estructuras que sobresalen desde la membrana celular como los lipopolisacáridos (La Duc y cols., 2003), adhesinas y otras proteínas y ácidos lipoteicoicos, pueden desempeñar papeles importantes en la adhesión microbiana (Chmielewski y Frank, 2003). Esto puede ser debido, entre otras causas, a que las sustancias poliméricas extracelulares también se producen en respuesta a la adhesión y al estímulo ambiental, como la presión osmótica, el pH, la temperatura y la falta de nutrientes (Costerton y cols., 1995).

Actualmente, la composición de la matriz de exopolímeros no está perfectamente definida. Aunque algunos autores han demostrado que contiene polisacáridos o glicoproteínas de distintos azúcares, como glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina y otras sustancias. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos o teicoicos. Se sirven de ellos para retener los nutrientes y para protegerse de los biocidas. En un biofilm maduro, la mayor parte de su volumen está ocupado por la matriz laxamente organizada (75-95%) alrededor de unas pocas bacterias (5-25%), que proporciona una cubierta gelatinosa y deslizante a la superficie colonizada, con un considerable volumen de agua disponible (Chmielewski y Frank, 2003).

Para la unión irreversible entre la célula y la superficie es necesario un tiempo de contacto mínimo. Si bien, en general, el espacio temporal para el desarrollo de un biofilm es corto y varía en función de la temperatura, disponibilidad de nutrientes y presencia de antibióticos. En este sentido, varios estudios indican que las uniones irreversibles llevan de 20 minutos a 4 horas a una temperatura de entre 4 y 20°C (Mittelman, 1998; Stopforth y cols., 2002).

A pesar de todo, la mayoría de estudios que han permitido descubrir esta estructura han sido realizados en ambientes pobres en nutrientes como el agua. Sin embargo, en la industria alimentaria el contenido de nutrientes es elevado y se asocian con depósitos macroscópicos y microscópicos, unido al estrés bacteriano causado por la limpieza y desinfección, y otros factores cuya influencia no ha sido aún considerada (Chmielewski y Frank, 2003). En este sentido, Carpentier y Cerf (1993) observaron que las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) proporcionan protección a los

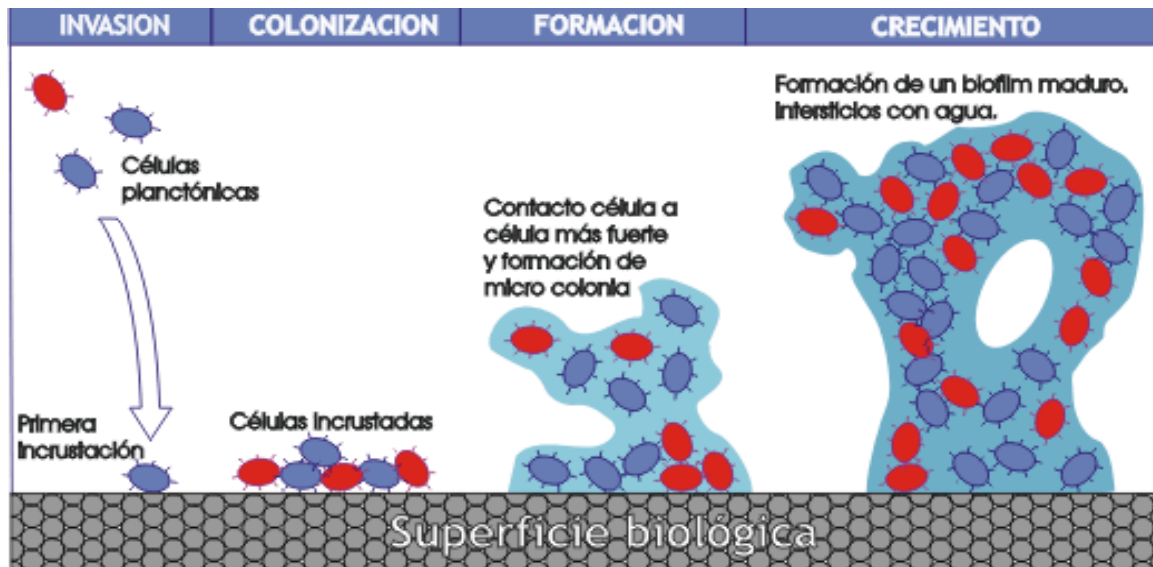
habitantes del biofilm mediante la concentración de nutrientes, previniendo el acceso de biocidas y la desecación y secuestrando metales y toxinas.

3. *Evolución y maduración del biofilm*: la secuencia de unión de diferentes especies bacterianas influye en la composición del biofilm resultante. La población inicial que se une puede cambiar las propiedades de la superficie y así, las que vienen después se pueden adherir vía asociación célula a célula. En algunos casos, la unión de unas segundas especies puede incrementar la estabilidad de la población del biofilm (McEldowney y Fletcher, 1988). En este sentido, Hood y Zottola (1997) demostraron que *L. monocytogenes* era más propensa a adherirse al acero en presencia de *Pseudomonas fragi*.

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente del biofilm, por naturaleza, desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le llama maduración. Un biofilm maduro puede consistir en una simple capa de células, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o embebidas por las sustancias poliméricas extracelulares (Chmielewski y Frank, 2003).

A medida que madura el biofilm, se adapta a los nutrientes, al oxígeno y los cambios poblacionales, formando microcolonias discretas separadas por canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas superiores permanecen porosas (Bishop, 1997). Las bacterias con un metabolismo más activo permanecen en la superficie de las capas de la matriz del biofilm, cerca de los canales de agua cuyo número se reduce con la edad del biofilm; en un biofilm joven se han detectado cerca de un 80% de células viables, y tan solo un 50% en un biofilm maduro (Carpentier y Cerf, 1993; Sharma y Anand, 2002).

Los canales de agua permiten la dispersión y el intercambio de sustancias orgánicas, cationes metálicos y metabolitos. Los nutrientes se atrapan y concentran en la matriz del biofilm y se mueven por ésta por difusión (Davey y O'toole, 2000).

Figura 1. Fases de formación de un biofilm.

2.3.6.2. *Factores que afectan al desarrollo del biofilm*

Algunos de los factores que afectan al desarrollo del biofilm, incluido las propiedades de la superficie y de la interfase, son (Chmielewski y Frank, 2003):

- La disponibilidad de nutrientes.
- La composición de la comunidad microbiana.
- La disponibilidad de agua.
- La interacción ínterespecífica.
- El transporte celular.

En los diversos medios donde se encuentran los microorganismos, se dan situaciones de abundancia e incluso de exceso de nutrientes, y situaciones de austeridad y falta de nutrientes. Esta última situación se da en el agua potable, especialmente en los sistemas de agua de alta pureza, donde las bacterias activan estrategias propias de cada especie. Unos microorganismos cambiarán su cubierta para hacerla más hidrófoba y dirigirse hacia las paredes; otros irán moviéndose directamente con sus flagelos o pili, y otros caerán al fondo por gravedad.

En la superficie donde lleguen habrá alguna molécula orgánica o mineral que permita un cambio energético mínimo. Las partículas del entorno o las de la misma superficie pueden suministrar el sustrato inicial, puesto que las bacterias como es el caso de *Legionella* spp. son capaces de obtener nutrientes de las tuberías o del revestimiento interno del sistema hídrico. *Legionella* spp. puede obtener trazas de metal a partir del acero inoxidable, concretamente el hierro es un mineral esencial para su desarrollo y crecimiento (Flemming, 1999). Los microorganismos oligotrofos serán los primeros en colonizar una superficie, y les seguirán aquellos que han evolucionado para encontrar y unirse a las superficies con tal de incrementar sus posibilidades de captar nutrientes.

2.3.6.3. Propiedades de las superficies de contacto

El tipo de sustrato influye en las características de unión. Las bacterias tienden a unirse al cristal (superficie hidrófila) uniformemente en una capa, mientras que en las hidrófobas como el nylon tienden a unirse en grupos (McEldowney y Fletcher, 1988).

El acero inoxidable se usa frecuentemente como material para la cocina y las instalaciones industriales porque es resistente a los golpes, a la corrosión, dura mucho tiempo y es de sencilla fabricación, además de ser estable, inerte y de fácil limpieza (Boyd y cols., 2001). A escala microscópica se observa como el acero presenta diminutas oquedades que no se ven macroscópicamente (Frank y Chmielewski, 2001), lo cual permite una mayor retención de bacterias por el incremento del número de puntos de adhesión. Boyd y cols. (2001) demostraron que los niveles de higiene en las superficies de contacto podían verse disminuidos con el uso y provocar que la superficie se deteriorase. Los defectos de las superficies pueden actuar como puntos de retención de microorganismos y materia orgánica. Las superficies rugosas acumulan suciedad y son de más difícil limpieza que las lisas. En consecuencia, los defectos de las superficies proporcionan protección a la suciedad y los microorganismos, lo que hace que las bacterias supervivientes puedan volver a multiplicarse y formar un biofilm (Boulangé-Peterman y cols., 1997).

Stevens y Holah (1993) demostraron que las bacterias estaban retenidas en las imperfecciones de las superficies. Por ello las superficies más dañadas retenían mayor número de bacterias.

Además, una vez allí, algunos microorganismos en los biofilms catalizan reacciones químicas y biológicas, causando corrosión del metal (Mittelman, 1998).

2.3.6.4. La protección: Resistencia a los biocidas

Mah y O'toole (2001) observaron que los biofilms y las bacterias adheridas a la superficie pueden resultar entre 10 y 100 veces más resistentes que las bacterias en suspensión.

Hay dos hipótesis que pueden explicar esta observación: La primera de ellas se basa en la actuación del biofilm como una barrera de difusión. La difusión del desinfectante es inversamente proporcional a su peso molecular, además dependiendo de la naturaleza química del desinfectante puede interactuar con macromoléculas del biofilm perdiendo su eficacia. La segunda hipótesis es que las bacterias dentro del biofilm sufren alteraciones fisiológicas confiriéndoles más resistencia frente los desinfectantes, aunque también depende de la naturaleza del mismo (Mattila-Sandholm y Wirtanen, 1992).

DeBeer y cols. (1994) observaron que el hipoclorito sódico no podía penetrar completamente en un biofilm mixto de *Pseudomonas-Klebsiella* (400 μm de grueso) después de 1 hora de exposición. Por lo que, propusieron que el propio biofilm era capaz de inactivar el hipoclorito sódico.

La eliminación de los biofilms no es una tarea fácil puesto que factores como la temperatura, el tiempo, y las fuerzas mecánicas y químicas intervienen de manera directa en el proceso de desadhesión (Wirtanen y cols., 2001a). De modo que la desinfección tras la eliminación del biofilm es requerida en las plantas de alimentación sobretodo en aquellas zonas donde queda humedad, puesto que se favorece las condiciones de crecimiento de los microorganismos (Mosteller y Bishop, 1993).

2.3.6.5. Microorganismos con capacidad de formar biofilms

A pesar de que todas las bacterias tienen la capacidad de formar biofilms hay algunos géneros que lo forman más fácil y rápidamente como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* y *Bacillus* (Mattila-Sandholm y Wirtanen, 1992). Además, entre los patógenos como *L. monocytogenes* también se ha descrito que tiene capacidad de formar biofilms, hecho que han constatado diversos investigadores (Zottola y Sasahara, 1994).

En un ambiente de procesado de alimentos, la flora es probable que sea una mezcla de muchas especies (Bagge-Ravn y cols., 2003b). Sin embargo, hoy en día no se conoce bien si la flora presente en las superficies y en el ambiente de una industria de procesado es fruto de un fenómeno de selección natural.

El conocimiento de la flora bacteriana residente en las instalaciones en el ambiente de una planta de procesado de alimentos sería información valiosa para el diseño del programa de limpieza y desinfección. En contraposición a los alimentos, en los que se ha investigado mucho sobre su ecología microbiana a lo largo de los últimos años, existe un vacío de información respecto a las superficies que contactan con dichos alimentos puesto que los esfuerzos se han centrado más en observar el comportamiento de patógenos específicos tales como *L. monocytogenes* (Fonnesbech y cols., 2001) o bacterias alterantes tales como *Pseudomonas spp.*. En estos estudios se pudo constatar que la contaminación del producto puede ser originaria directamente del equipo de proceso y además, los organismos como *L. monocytogenes* pueden persistir durante varios años (Mattila-Sandholm y Wirtanen, 1992).

2.4. Métodos de verificación y vigilancia de la limpieza y desinfección

2.4.1. Importancia del muestreo y la identificación de puntos de muestreo

Los análisis microbiológicos constituyen uno de los métodos de evaluación de la calidad microbiana de los alimentos y de la higiene de los utensilios, equipos y superficies que intervienen en el proceso de elaboración. Cuando resulta imposible analizar la totalidad del universo poblacional se emplean métodos de muestreo, de cuya sensibilidad y exactitud

dependen de los resultados obtenidos y por consiguiente afectan a las decisiones a tomar (Pecorelli y cols., 1993).

La obtención de muestras representativas de ciertos productos o elementos relacionados con la industria es complicado debido a la heterogeneidad, tanto espacial como temporal, así como a problemas técnicos relacionados con el sistema de muestreo de la industria. Los microorganismos se encuentran plenamente instalados en cualquier parte de una industria, de forma que en muchas ocasiones colonizan lugares de difícil acceso, lo cual es beneficioso para ellos, ya que así su supervivencia estará garantizada. Como hemos mencionado anteriormente es frecuente hallar microorganismos en el interior de las grietas, recovecos, puntos ciegos de circuitos, juntas y un sinfín de lugares que la mayoría de las veces el operario olvida (no se contemplan) al realizar el control de superficies, y sin embargo son puntos de control críticos en materia de higiene de instalaciones (Wirtanen y cols., 2001a).

La industria alimentaria realizaba exámenes microbiológicos, de forma rutinaria, sobre las materias primas y el producto acabado con el fin de controlar la calidad y la seguridad del producto, y sobre las superficies, equipos, utensilios y personal manipulador, para controlar la efectividad de la higiene aplicada durante el proceso (Pecorelli y cols., 1993). En la actualidad este procedimiento se considera obsoleto puesto que el problema de hacer análisis de producto final es que se detecta el problema pero no se pueden identificar las causas. Se considera que ningún método de análisis microbiológico viable permite afirmar con total seguridad que el producto analizado presenta la calidad microbiológica deseada, pero si nos indica la probabilidad de que sea cierto (ICMSF, 1996).

En la gran mayoría de las industrias alimentarias, por razones materiales, prácticas y/o económicas, se realizan los análisis microbiológicos sobre unidades de muestra de las cuales deben extraerse los microorganismos para ser cuantificados, aislados e identificados si la situación lo requiere (Pecorelli y cols., 1993). Un factor fundamental para realizar correctamente dichos controles es el método de muestreo, el cual debe ser simple, rápido, económico, sensible y no presentar riesgo para el operador o el alimento (Moore y cols., 2001).

2.4.2. Métodos clásicos

Tradicionalmente los métodos de control de superficies se agruparon según el método de muestreo en cuatro categorías (ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1988; Mossel y cols., 1995):

- *Hisopados*: consisten en la frotación de área limitada con un hisopo o una esponja. Tras el hisopado se introducen en un tubo con diluyente a partir del cual se realizará el estudio microbiológico, dando los resultados en unidades formadoras de colonias (ufc) por cm².
- *Enjuagues*: se agrega un volumen determinado de solución estéril de dilución sobre la superficie a hacer un muestreo, se lava y se recupera el líquido para efectuar los estudios microbiológicos.
- *Métodos de impresión por contacto*: se hace contactar la superficie a estudiar de forma directa o indirecta con el medio de cultivo, el cual se incuba para efectuar los recuentos.

2.4.2.1. Ventajas e inconvenientes de las técnicas clásicas

Las técnicas de análisis microbiológico más utilizadas para verificar el grado de desinfección de las instalaciones, tras el proceso de higienización, son aquellas que se realizan mediante la toma de muestras con placas de contacto y el escobillonado de las superficies higienizadas (Pontrefract, 1991).

Estos métodos reflejan si quedan restos de contaminación microbiana una vez se ha desinfectado una zona. Sin embargo, en este caso siempre es aconsejable realizar dos muestreos, antes de la desinfección y después de la misma con el fin de averiguar realmente la efectividad del desinfectante (Collado, 1994; Puig-Durán y cols., 1996).

Las placas de contacto como las placas Rodac, en general, no son las más adecuadas para la evaluación de la eficacia de los desinfectantes puesto que sólo son eficaces en superficies

llanas, lisas y con recuentos microbianos bajos, ya que no es posible hacer diluciones (Pontrefract, 1991). Asimismo, otra desventaja que presenta el método de placa de contacto es que no permite el estudio de los biofilms adheridos a las superficies porque para su determinación es necesario que se produzca la ruptura de su estructura. En cuanto a la técnica de escobillado su principal problema radica en que hay variaciones individuales en la forma de hisopar la superficie. Debido a ello, no suele ser reproducible, observándose una elevada variabilidad de recuentos por área de muestra. Otro inconveniente que posee la técnica es que los microorganismos adheridos y los biofilms en general, no se recuperan bien con el hisopo, o bien, pueden quedar retenidos en el capuchón y no ser transferidos a los medios de cultivo. En consecuencia, los recuentos obtenidos en general se infraestiman (Moore y cols., 2001). No obstante, algunos autores han demostrado que en función del material que constituye el capuchón del hisopo se recuperan más bacterias de las superficies. Concretamente, estos autores concluyeron que los hisopos de algodón y de espuma recuperaban más bacterias de las superficies húmedas que el resto de hisopos evaluados. Además estos mismos autores observaron que la composición del diluyente también podía jugar un papel importantísimo en la liberación y disgregación de las bacterias que están retenidas en el hisopo (Moore y Griffith., 2002b).

Otra desventaja de las técnicas basadas en la microbiología clásica es la obtención de resultados. Tanto las técnicas de escobillado como las de aplicación por impresión son lentas debido a su incubación previa a la lectura, los resultados no se obtienen hasta las 48 horas como mínimo. En el caso de resultados no satisfactorios, no es posible adoptar medidas correctoras inmediatas, por lo que desde este punto de vista, no son útiles para ejecutar el plan de vigilancia del sistema de autocontrol.

Esta limitación temporal, que afecta a su validez como herramienta de control inmediato, podría superarse con métodos más rápidos de comprobación de la eficacia de la limpieza y desinfección (Valcárcel y cols., 2002). Además, algunas técnicas denominadas métodos rápidos (Fung, 2002), permiten cuantificar y demostrar la viabilidad de los microorganismos que permanecen en las superficies de contacto con alimentos en cuestión de minutos o en menos de 24 horas en función de la técnica elegida (Pontrefract, 1991).

A pesar de que estas técnicas poseen algunas limitaciones, actualmente siguen siendo técnicas aceptadas y de uso común para la detección de bacterias en superficies de contacto. Por lo

tanto, es necesario seguir trabajando en la mejora de éstas técnicas para optimizar el protocolo de escobillado tradicional y de las técnicas de impronta (Moore y Griffith, 2002a).

En la actualidad todavía no existe ningún método de control de superficies suficientemente sólido para adoptarlo como estándar (Moore y Griffith, 2002b). A nivel europeo existe la Decisión (2001/471/CE) (Anónimo, 2001), por la que se establecen normas para los controles regulares de la higiene en establecimientos de carnes frescas, y con la Directiva 71/118/CEE, relativa a problemas sanitarios en materia de intercambios de carnes frescas de aves de corral que han quedado derogadas en parte, por el Reglamento 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. La parte que ha quedado en vigor, describe como realizar el control de superficies de mataderos y salas de despiece así como los límites microbiológicos permitidos. En el actual Reglamento 2073/2005 únicamente cita “La toma de muestras del entorno en donde se llevan a cabo los procesos de producción y transformación en la industria alimentaria es un instrumento útil para identificar y prevenir la presencia de microorganismos patógenos en los productos alimenticios. No menciona ni el método ni el criterio que debe utilizarse para el control de las superficies pero si que se resalta la posibilidad de utilizar métodos alternativos rápidos validados (Anónimo, 2005).

2.4.3. Técnicas rápidas

Muchas técnicas denominadas como técnicas rápidas fueron inicialmente desarrolladas para aplicaciones clínicas (años 60 y 70), siendo posteriormente adaptadas para ser usadas en alimentos, existiendo un retraso de aproximadamente 10 años con respecto al área médica. Sin embargo, durante la última década ha existido un creciente interés en el ámbito internacional en la adaptación y en la investigación sobre métodos rápidos en el campo de la microbiología de los alimentos (Fung, 2002).

La necesidad de reducir tiempos de detección de los microorganismos ha llevado al desarrollo de nuevas metodologías que permiten con la misma fiabilidad, reproducibilidad y repetitividad que los ensayos clásicos, la certificación de la calidad de los productos alimentarios. Estas nuevas metodologías fundamentan su aplicación en la detección de microorganismos de manera indirecta o directa. Entre los sistemas indirectos los más utilizados para el control de superficies son las técnicas de bioluminiscencia, de

inmunoensayo y de impedancia eléctrica. No obstante, el uso de métodos indirectos puede inducir a resultados erróneos. A diferencia de los sistemas directos, cuyo fundamento principal es el recuento directo de las bacterias, como es el caso de la técnica de microscopia de epifluorescencia directa (DEM) (Holah y cols., 1988).

2.4.3.1. Características de las técnicas rápidas

Existen una serie de atributos que deben tenerse en cuenta al elegir un sistema de análisis microbiológico rápido y/o automatizado (Fung 2002)

1. *Criterios estrictamente microbiológicos*: los métodos rápidos deben ser exactos para la finalidad que se pretende, tan sensible como sea posible, y con una mínima producción de resultados falsos positivos y/o falsos negativos. También si se va a analizar una flora determinada deberán tener una alta especificidad.
2. *Velocidad*: deben ser más rápidos que los métodos tradicionales. Esta reducción en el tiempo para la obtención de resultados puede deberse a uno o varios de los siguientes factores: simplificación de los existentes, mayor rapidez intrínseca de los nuevos métodos, mecanización, automatización y capacidad de los instrumentos empleados. De hecho algunos análisis son casi instantáneos, por ejemplo las medidas de ATP en la verificación del grado de higiene, o los análisis enzimáticos rápidos como la prueba de la catalasa. En el momento actual se considera una prueba como “rápida” si el resultado es obtenido en 4 horas desde el momento de inicio de la misma (Fung, 2002). Por otra parte hay instrumentos que pueden procesar decenas o centenas de muestras al mismo tiempo, como es el caso del BactometerTM, lo cual será especialmente importante para los laboratorios que tengan que examinar grandes cantidades de muestras.
3. *Coste*: en este factor se incluye el coste inicial de compra del equipo, y el posterior coste por prueba (coste de reactivos y materiales necesarios, coste de personal etc).

4. *Aceptabilidad*: para un método nuevo tenga éxito, debe ser aceptado por la comunidad científica (estudios colaborativos, verificación por organismos de prestigio como *Association Française de Normalisation, International Organization for Standardization, Association of Official Analytical Chemists* (AFNOR, ISO, AOAC).
5. *Simplicidad*: además, los métodos deben ser fáciles de operar y manipular y a ser posible automatizados.
6. *Entrenamiento*: a medida que los instrumentos se vuelven más simples y automatizados, el entrenamiento se vuelve más fácil y lleva menos tiempo.
7. *Reactivos y suministros*: los reactivos y materiales específicos que se necesitan para realizar la prueba han de estar fácilmente disponibles. Además los reactivos han de ser estables y fáciles de preparar.
8. *Reputación de la compañía*: las compañías con larga historia de buena reputación ganarán más fácilmente la confianza del consumidor. Las compañías nuevas o menos conocidas deben apoyarse en el buen funcionamiento de sus productos.
9. *Servicio técnico*: una compañía que pueda garantizar un servicio técnico rápido tendrá preferencia en este campo competitivo.
10. *Requerimiento de espacio*: en general se prefiere que los instrumentos sean compactos y pequeños.

2.5. Aplicación de las técnicas rápidas para el control microbiológico e higiénico de superficies

2.5.1. Microscopia directa de epifluorescencia

La microscopía de epifluorescencia directa está basada en la técnica de microscopía de epifluorescencia por filtración que fue descrita por Holah y cols. (1988). Estos autores fueron de los primeros investigadores que adoptaron la DEM como sistema de control de la higiene

de superficies. Se trata de una técnica que permite cuantificar y demostrar la viabilidad de los microorganismos que permanecen en las superficies de contacto con alimentos en menos de treinta minutos (Pontefract, 1991).

Para la cuantificación de células viables y no viables se utilizan sistemas de recuento automáticos basados en programas informáticos que analizan las imágenes obtenidas y mediante la ordenación de una serie de parámetros se puede obtener una valiosa cantidad de información en poco tiempo. Además por el hecho de ser un proceso parcialmente automatizado, permite visualizar un mayor número de campos y ello se traduce a una reducción del límite de detección hasta de 100 UFC/ml o cm² (Maukonen y cols., 2003). Además, como se analiza una imagen, ésta se puede almacenar en un soporte informático y ser analizada, reanalizada o interpretada por otros laboratorios, sin necesitar la presencia física de una especialista en cada momento (Rodrigues y cols., 2001).

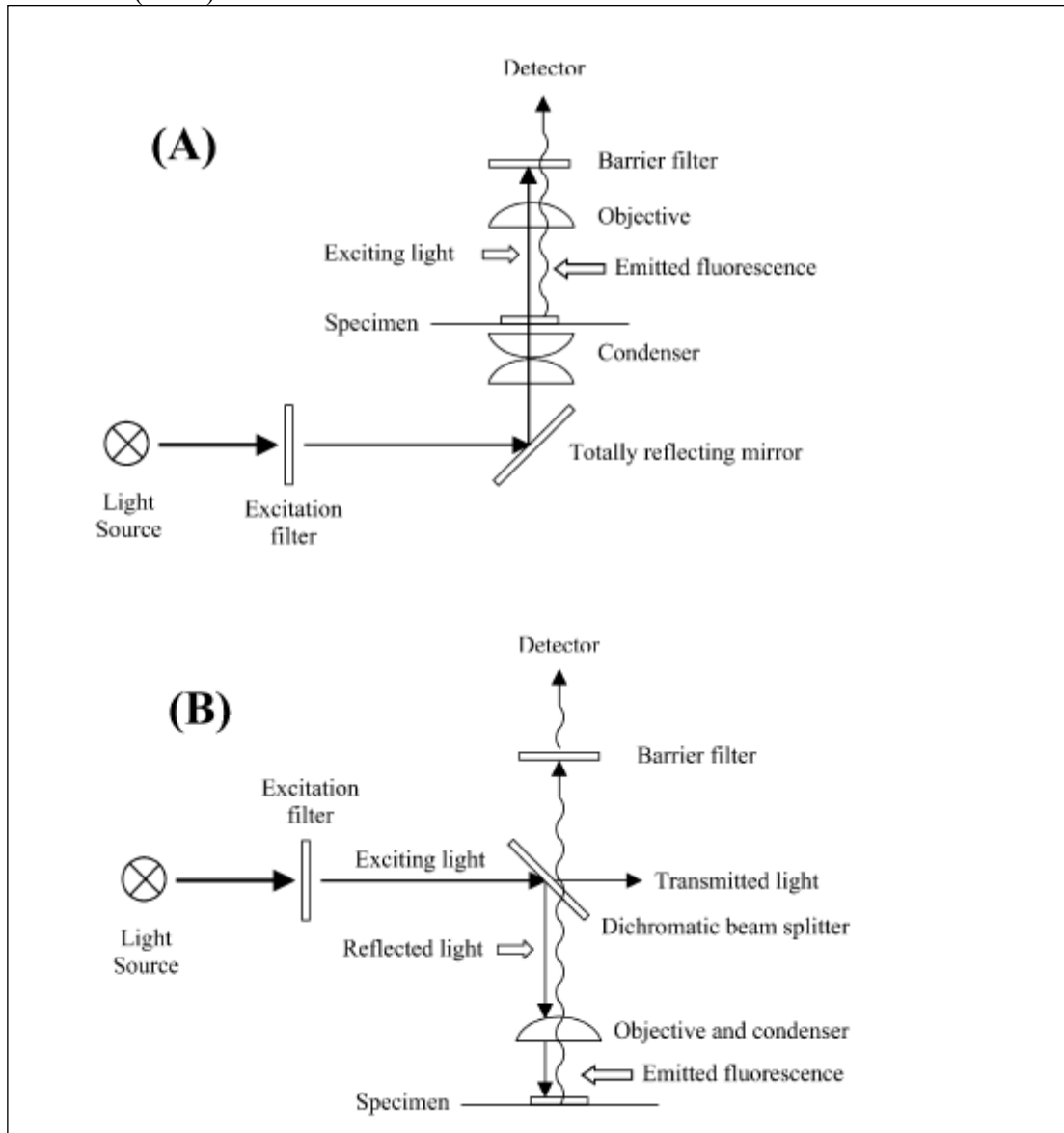
2.5.1.1. Clasificación de los microscopios de fluorescencia

Los microscopios de la fluorescencia según su trayectoria óptica se pueden clasificar en dos tipos (**Figura 2**):

- a. microscopios de fluorescencia de transmisión de luz.
- b. microscopios de la fluorescencia de luz incidente o epi-iluminación.

Los microscopios de fluorescencia de transmisión de luz requieren una alineación cuidadosa del condensador y de las lentes de los objetivos para evitar interferencias entre la excitación con la fluorescencia emitida. Sin embargo en el dispositivo de epi-iluminación, el condensador es también el objetivo. Por lo tanto, solamente existe una trayectoria óptica al detector (es decir, el de la fluorescencia emitida) y la alineación es perfecta. Este microscopio es similar al microscopio convencional, a excepción de que la luz incidente que procede de una potente fuente atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo, antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo (Takeuchi y Frank, 2001).

Figura 2. Paso de la luz a través de un microscopio de fluorescencia de transmisión (A) y un microscopio de epifluorescencia (B). Modificado por Herman (1998).



Todas estas ventajas hacen de la microscopia de epifluorescencia el sistema más comúnmente empleado (Herman, 1998). En este sentido, Maukonen y cols. (2000) consideraron que la microscopia de fluorescencia como una técnica moderna en el campo de la investigación biomédica donde la fluorescencia aporta cinco atributos interesantes a la microscopía: especificidad, sensibilidad, espectroscopia, resolución temporal y espacial.

2.5.1.2. Componentes principales

Los elementos principales del microscopio de epifluorescencia se describen a continuación (Herman, 1998) (**Figura 2**).

- *Primer filtro de corte o filtro de excitación:* Es el filtro que selecciona la luz de la longitud de onda incidente.
- *Espejo de ranuras ordenadas o espejo dicroico:* Se trata de un espejo que tiene la propiedad de reflejar la luz de ciertas longitudes de onda y de dejar pasar otras.
- *Segundo filtro de corte o filtro de emisión:* Es el filtro que selecciona la luz de longitud de onda fluorescente.

Las posibles fuentes de luz corresponden a lámparas halogenadas de tungsteno, mercurio de alta presión, xenón, combinación de lámparas o láser de mercurio y xenón, capaces de emitir la energía de la excitación en diversas longitudes de onda. La excitación máxima de la fluorescencia ocurre cuando el pico de la longitud de onda de luz está cerca del límite de absorción de la molécula fluorescente (Herman, 1998).

2.5.1.3. Principio de fluorescencia

La fluorescencia es una característica intrínseca de algunos átomos y moléculas que tienen la capacidad de absorber la luz de una determinada longitud de onda y emitirla a otra longitud de onda más fuerte el punto larga. Cada átomo o molécula fluorescente puede absorber solamente ciertas longitudes de onda de la luz. Tras absorber un fotón de energía, el electrón de una molécula fluorescente se excita y pasa a un nivel de energía y vibración más alto (Herman, 1998).

El electrón cargado de energía cuando vuelve al estado energético normal se produce una pérdida de energía vibratoria en el ambiente produciéndose la emisión de un fotón de luz de una longitud de onda más alta. Si un componente de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud

de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro. Algunas moléculas son autofluorescentes y emiten fluorescencia cuando están excitadas. Este fenómeno se llama fluorescencia primaria (Takeuchi y Frank, 2001).

La fluorescencia secundaria representa la emisión producida después de que una molécula se combine con una molécula fluorescente primaria denominado fluorocromo. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada (Takeuchi y Frank, 2001).

2.5.1.4. Evaluación de la viabilidad de los microorganismos

Evaluar el estado vital de los microorganismos es crucial para aplicaciones como la detección y enumeración de bacterias alterantes de los alimentos, la evaluación de la eficacia de inactivación de un tratamiento, el control de cultivos estériles, la biodegradación, etc. En general, las células viables se definen como aquellas células capaces de desarrollar todas las funciones necesarias para sobrevivir bajo unas condiciones dadas. La supervivencia de las bacterias se define como la continua existencia de las especies (Breeuwer y Abee, 2000). Habitualmente la capacidad que tienen las células en reproducirse es considerado como el signo de viabilidad por autotomía y el método de recuento en placa es el más utilizado para evidenciarlo. No obstante, como ya se mencionó anteriormente este método es largo en cuanto a la obtención de resultados y además, los microorganismos muertos, con lesiones subletales, en estado viable pero no cultivables (VBNC), durmientes o inactivas, no son capaces de formar colonias y no se tienen en cuenta. Por otro lado, el recuento en placa de células viables tiene otras limitaciones como son: la presencia de agregados bacterianos que se observan como una sola colonia, la presencia de sustancias inhibitoras producidas por flora competidora, así como la composición del medio de cultivo. Factores que pueden producir un falso resultado que en general se traduce en una infraestimación del recuento microbiano (Breeuwer y Abee, 2000).

Para que un microorganismo viable pueda sobrevivir los elementos esenciales y necesarios que han de presentar son: la membrana citoplasmática esté intacta, que se transcriba el DNA, y traducir del RNA, generar energía (ATP) para mantener el metabolismo, biosíntesis de

proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y otros componentes celulares; y, finalmente, crecer y multiplicarse.

Los métodos de evaluación de la viabilidad celular se basan en estas necesidades (**Tabla 2**). Las principales ventajas de las tinciones de viabilidad son: sensibilidad, resolución inmediata, y posibilidad de analizar las células individualmente gracias a un programa de análisis de imagen. La combinación de estas técnicas con los tremendos avances en el desarrollo de nuevas pruebas ópticas como el DEM y las enormes mejoras en las posibilidades técnicas de analizar el nivel de fluorescencia celular, facilitan comprender porqué la aplicación de pruebas fluorescentes han aumentado rápidamente en la última década (Breeuwer y Abee, 2000).

Tabla 2. Criterios y métodos para evaluar la viabilidad de los microorganismos.

Criterio	Método	Tiempo	Comentarios
Reproducción	Recuento en placa	2-5 días	Sensibilidad alta
Morfología celular (elongación celular)	Inhibición celular por el ácido nalidíxico	6 h	Bacterias sensibles a los antibióticos
Integridad de membrana	Tinciones por exclusión de métodos	30 min	Las células viables con membrana plasmática intacta no se tiñen
Respiración	Tinciones de reducción del tetrazolio en células con electrones activos en la cadena de transporte	1-4 h	Acumulación de formazan insoluble.
Actividad enzimática	Método del diacetato de fluoresceína (FDA)	30 min	Potencial dependiente
Potencial de membrana	Distribución de la Rhodamina 123, tinciones carboxicianina	1h	Las células viables mantienen un gradiente de pH
Gradiente pH	Mediciones intracelulares del pH (derivados de la fluoresceína)	1h	

Fuente: Breeuwer y Abee (2000)

2.5.1.5. Tinciones fluorescentes para determinar la integridad de membrana

Las tinciones biológicas como el azul de metileno y el rojo Congo llevan utilizándose desde principios del siglo XX como sustancias para determinar la integridad de la membrana (Breuwer y Abee, 2000). El principio general de esta tinción se basa en que las células con la membrana plasmática intacta no se tiñen. Sin embargo, las células con la membrana celular comprometida permiten la entrada de los colorantes y el resultado es que la célula queda teñida. El uso de tinciones de ácidos nucleicos como son el yoduro de propidio (PI), bromuro de etidio (EB), PO-PRO™-3 iodine, y SYTOX® Green son sustancias que permiten evaluar la viabilidad basándose en el mismo principio. Entre estas sustancias el PI es la que más comúnmente se utiliza. Entre las varias aplicaciones que se le han dado al PI destacan el análisis de *E. coli* frente a distintos antibióticos como la gentamicina, y la ciprofloxacina (Gant y cols., 1993); la diferenciación entre células viables y no viables de *E. coli*, *B. subtilis* y *Pseudomonas* spp. (Williams y cols., 1998), la determinación del nivel de estrés de células de *Lactococcus lactis* (Bunthof y cols., 1999).

Sea o no sea el criterio de valoración de la integridad de membrana como signo de viabilidad celular su valoración es un hecho que plantea controversias. Breuwer y Abee (2000) demostraron que un porcentaje significativo de células muertas tratadas por calor de *E. coli* se tiñeron con una intensidad muy baja con PI, y Lopez-Amoros y cols. (1995) concluyeron que la membrana citoplasmática permanecía intacta en células de *E. coli* y *Salmonella* en estado de inanición así como de VBNC, ya que no se tiñeron con PI. Esta sustancia se comercializa en forma de kits, como por ejemplo el kit “Live/Dead® BacLight Bacterial Viability Kit” (Molecular Probes, Oregon, USA). El kit proporciona dos fluorocromos que se fijan al ácido nucleico de la célula: el SYTO® 9 y el yoduro de propidio (PI). Las células con la membrana plasmática intacta son permeables al SYTO 9® pero no al yoduro de propidio, por lo tanto, se teñirán de color verde. Las células que tienen la membrana plasmática dañada penetran los dos colorantes, así el yoduro de propidio reduce el SYTO® 9 y por lo tanto tiñe las bacterias de color rojo (Maukonen y cols., 2000).

El kit Live/Dead® BacLight Bacterial Viability fue utilizado para demostrar la viabilidad de *E. coli* O157:H7 (a pesar de no recuperarse mediante cultivo convencional) aislado de una ría de agua dulce y de agua salada artificial mediante la utilización de un microscopio de epifluorescencia (Rigsbee y cols., 1996).

La tinción fluorescente SYTOX que tiñe los microorganismos de color verde, también se ha aplicado para evaluar la viabilidad de *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* spp. (Breeuwer y Abee, 2000).

2.5.1.6. Tinciones fluorescentes para determinar la actividad respiratoria

La energía reductora producida en la cadena de transporte del electrón se puede utilizar para cuantificar la actividad respiratoria celular mediante microscopia directa. Las sales de tetrazolio, 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-cloro fenil tetrazolio (INT), son moléculas solubles en agua, membrana permeables con un componente de color incorporado, que tras incorporarse en la cadena de transporte electrónico se convierten en compuestos insolubles dando lugar a sales de formazan que muestran un aspecto de color rojo cuando se visualizan con un microscopio óptico convencional. La enumeración de las células viables, se realiza mediante el recuento de aquellas células que muestran una coloración roja en su interior debido a la presencia y acumulación de cristales correspondientes a sales de formazan (Takeuchi y Frank, 2001).

Recientemente, el cloruro del tetrazolium 5-cyano-2,3-ditoly (CTC) es la sustancia que se está utilizando de manera más generalizada y fue sugerida por Rodriguez y cols. (1992). Además, CTC-formazan no se disuelve en aceite de la inmersión, por lo tanto puede utilizarse con objetivos de alta magnificación, pero que requieren aceite de inmersión (Rodriguez y cols., 1992).

El CTC se ha utilizado para estudiar la fisiología de los microorganismos en circuitos de agua potable, la enumeración de *L. monocytogenes* tras someterse a un estrés por calor, y la visualización de biofilms de *Klebsiella pneumoniae* (Takeuchi y Frank, 2001).

2.5.1.7. Tinciones fluorescentes para determinar la actividad enzimática

Existen varias tinciones vitales basadas en la presencia de actividad enzimática en las células metabólicamente activas, hecho diferencial entre una célula viable y una no viable. Aunque algunas células pueden tener su actividad metabólica comprometida y por lo tanto no mostrar

crecimiento en un medio de recuento en placa convencional. El diacetato de fluoresceína (FDA) es un éster apolar no fluorescente que atraviesa la membrana hidrofóbica de la célula y se hidroliza dando lugar a un éster polar con fluoresceína. La fluoresceína queda retenida a la membrana debido a su baja permeabilidad de modo que la acumulación de fluoresceína indica la presencia de la actividad enzimática y la integridad de la membrana celular (Takeuchi y Frank, 2001).

Sin embargo, el FDA presenta una cierta permeabilidad de las membranas de las bacterias Gram negativas, dando lugar a resultados falsos negativos. Además el FDA puede hidrolizarse espontáneamente en presencia de soluciones alcalinas (Takeuchi y Frank, 2001).

2.5.1.8. Recomendaciones de uso o empleo

Tanto las técnicas analíticas de microscopía de epifluorescencia, la técnica de filtración por fluorescencia directa (Holah y cols., 1988) y el microscopio láser confocal, son técnicas que permiten valorar y analizar la presencia de bacterias viables pero no cultivables, bacterias lesionadas, así como la presencia de biofilms en la superficie tras la limpieza y desinfección. Ello es ventajoso ya que, en ocasiones, los desinfectantes producen lesiones subletales a los microorganismos, que impiden su multiplicación en los medios de cultivo habituales. En esta situación, se puede considerar que un desinfectante tiene actividad antimicrobiana cuando en realidad posee una elevada actividad lesiva o estresante sobre los microorganismos que pasan a un estado viable pero no cultivable (Herald y Zottola, 1988).

Por lo tanto el examen directo sobre superficies contaminadas, la determinación de la viabilidad de los microorganismos y su resistencia real a ciertos desinfectantes puede dar una información de gran valor en el control aplicado en las superficies de procesado y en la elaboración de alimentos (Pontefract, 1991). Por otra parte, varios investigadores han señalado que el recuento de células por microscopía directa, en general, suele ser un logaritmo (ufc/cm^2) superior que el método de cultivo en placa (Boulos y cols., 1999). Esto puede ser por la presencia de bacterias viables pero no cultivables o que una gran cantidad de bacterias permanecen adheridas en las superficies tras la desinfección, que no se recuperan mediante los métodos tradicionales más utilizados (Caro y cols., 1999; Moore y Griffith, 2002b).

A pesar de que la microscopia de epifluorescencia es una herramienta útil para la visualización de los biofilms, la microscopia de láser confocal es según Takeuchi y Frank (2001) la técnica de elección puesto que permite visualizar un biofilm, además de observar su estructura tridimensional, y por lo tanto de obtener información más detallada.

2.5.2. Métodos impedanciométricos

La impedancia eléctrica es una poderosa herramienta microbiológica que reúne las cualidades de rapidez y sencillez (Silley y Forsythe, 1996).

Entre las aplicaciones fundamentales en la industria alimentaria, destaca el recuento de aerobios totales, de levaduras, de enterobacterias, de coliformes, así como la confirmación de la ausencia de patógenos como *Salmonella*, *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*. También se ha aplicado para el recuento de psicrófilos, lactobacilos, para evaluar la resistencia a los antibióticos y para evaluar la eficacia desinfectante en suspensión y en superficie (Silley y Forsythe, 1996).

La detección cuantitativa y cualitativa de microorganismos mediante el sistema de impedancia eléctrica se realiza mediante la medición de la actividad metabólica de los mismos de manera indirecta. De este modo, mucho antes de que una colonia pueda ser visible en un medio de cultivo sólido, es posible detectar la actividad de los microorganismos y extrapolarla a un número teórico de éstos (Edmiston y Russell, 1998).

El fundamento de la impedancia eléctrica se basa en que las moléculas del medio de cultivo: proteínas, hidratos de carbono etc. son eléctricamente neutras o están débilmente ionizadas. Estas moléculas se transforman, por acción de los microorganismos, en numerosas moléculas más pequeñas, de carga y movilidad eléctrica más elevada, como por ejemplo aminoácidos, lactatos etc. Estas modificaciones son mesurables mediante dos electrodos sumergidos en el medio de cultivo. Debido a que la medición de la impedancia depende de los cambios metabólicos, factores como el medio de cultivo, tiempo y la temperatura, son parámetros críticos en los ensayos. Cuando la población alcanza los niveles de 10^5 a 10^7 ufc/ml, se puede observar un cambio significativo en la señal de la impedancia, conductancia, o capacitancia del medio. El tiempo que se requiere para lograr este cambio exponencial es conocido como

Tiempo de Detección (DT) y está en función del recuento (ufc/ml) de las muestras. Así que el cambio eléctrico puede ser correlacionado, de forma indirectamente proporcional, con el número de microorganismos (Edmiston y Russell, 1998).

El uso de técnicas impedanciométricas permite evaluar la eficiencia de los diferentes productos desinfectantes y principios activos. Algunos autores evaluaron la eficacia de diferentes desinfectantes como el hipoclorito, ácidos, peróxidos, formaldehído y amonios cuaternarios utilizando *Listeria innocua* y dos cepas de *Streptococcus* y microorganismos de referencia como son *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Holah, 1995b; Duran y Marshall, 2002).

La ventaja de las técnicas impedanciométricas es que no importa que los microorganismos estén en suspensión o adheridos a la superficie, mientras estén vivos pueden cambiar las propiedades eléctricas del medio de incubación. Esto hace a la técnica particularmente adecuada para ensayos de actividad de los desinfectantes en superficies, ya que no es necesario separar los organismos de la superficie de prueba para su cuantificación y no los enfrenta a un estrés por separación, por lo que no influirá negativamente en la eficacia del desinfectante, más bien todo lo contrario (Gibson y cols., 1995).

2.5.3. Medición de ATP por bioluminiscencia

Durante la última década, la detección del ATP (trifosfatos de adenosina) por bioluminiscencia es una de las tecnologías emergentes como método de análisis microbiológico rápido debido a que proporciona en tiempo real una valoración estimada de la higiene de la superficie total (Davidson y cols., 1999). La detección del ATP por bioluminiscencia se basa en la detección de la energía celular de los organismos vivos. La enzima luciferasa, proveniente de la luciérnaga (*Photinus pyralis*), es añadida a la muestra que contiene ATP junto con la luciferina. Al oxidarse la luciferina emite fotones de luz que pueden ser medidos en un luminómetro (Champiat y cols., 2001). La cantidad de luz generada es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra (Fung, 2002). El ensayo presenta algunas limitaciones que pueden influir en la reacción, como el pH, la temperatura, o la presencia de inhibidores del enzima (Boer y Beumer, 1999). Por otro lado si se requiere que el ensayo detecte únicamente microorganismos se debe segregar tanto el ATP microbiano como

el ATP somático, ya sea por filtración y/o destrucción del ATP somático, lo cual prolonga el tiempo de ensayo y disminuye la sensibilidad (Maukonen y cols., 2003). El uso del ATP para estimar el recuento total de células viables tiene un límite de detección de 10^4 o 10^5 (Vanne y cols., 1996; Boer y Beumer, 1999; Corbitt y cols., 2000).

Los ensayos de bioluminiscencia pueden ser suficientes cuando en una planta predomina el interés por el control general de la higienización, sin necesidad del aislamiento, recuperación, e identificación de una bacteria específica (Gracias y McKillip, 2004). Además, la medición de ATP como sistema de evaluación de la desinfección y su uso como método de vigilancia de las instalaciones se ha puesto en duda debido a distintos factores (Griffith y cols., 1997):

- Las condiciones fisiológicas, el tipo y número de microorganismos contaminantes presentes en el área de procesado de alimentos
- El tipo de respuesta microbiana frente a la limpieza y desinfección
- El tipo y la cantidad de suciedad presente

Tanto los microorganismos como los restos celulares contenidos en los alimentos contribuyen al contenido total de ATP retenido en el hisopo, y por lo tanto se convierte en un método de vigilancia tanto del proceso de limpieza como el de higienización general. Hay autores que han demostrado su uso con éxito en industria de zumos, en la industria cárnica y en el sector de la restauración colectiva (Davidson y cols., 1999).

Actualmente existen muchas compañías que fabrican los kits asociados al equipo para realizar los análisis. Indudablemente aquellos que sean pequeños, portátiles y fáciles de usar, a ser posible con reactivos de un solo uso, son los que, en principio, cumplen mejor las expectativas deseadas de un método rápido y por consiguiente son de elección para la industria alimentaria (Griffith y cols., 1997).

3. Aplicación de sistemas de higienización en canales

3.1. Marco legal

En los últimos años debido a la incidencia creciente de brotes alimentarios causados por *Escherichia coli* O157:H7 atribuidos al consumo de carne de vacuno, las autoridades sanitarias de los Estados Unidos de América (EUA) vieron la necesidad de emplear un conjunto de medidas para su control (Sofos y cols., 1999). En este ámbito el *United States Department Agricultural-Food Safety Inspection Service* (USDA-FSIS) dictaminó una política de tolerancia cero para controlar la incidencia de éste patógeno y de *Listeria monocytogenes* en la carne, y declaró que la presencia de estos patógenos en la carne de consumo se consideraría como carne adulterada (Anónimo, 1996). Estas regulaciones, que son de obligado cumplimiento, incluyen una re-evaluación del sistema APPCC y establecen cambios en las medidas de control, como por ejemplo, su validación en planta.

La industria cárnica está trabajando con distintas medidas de intervención (físicas y químicas) para la descontaminación microbiana de las canales, así como las técnicas de valoración del riesgo efectivo para evaluar mejor dicho riesgo, suministrar información relacionada con la identificación y caracterización del peligro y las vías para el control del riesgo asociado a los peligros (Sofos y Smith, 1998). La evaluación de los riesgos biológicos para cada uno de los productos, así como el desarrollo de sistemas de control sobre microorganismos patógenos emergentes, y finalmente, la demanda por parte del consumidor de mayor variedad de productos, sobretodo aquellos que se denominan listos para consumir, son razones de peso suficiente para desarrollar una política de intervención cuyo objetivo principal está basado en un aumento del nivel de control para garantizar la seguridad de los productos cárnicos frescos (Sofos y Smith, 1998).

En la Unión Europea, sin embargo, el uso de estas sustancias químicas no está permitido hasta que no se mejoren las condiciones de higiene. No obstante, a nivel estatal se están realizando estudios que demuestran la eficacia de su aplicación como es el estudio presentado recientemente por el Centro Tecnológico de la Industria Cárnica (CTIC) sobre la eficacia del ácido láctico para la descontaminación de pollos refrigerados (Gonzalez y Gonzalez-Fandos, 2004).

3.2. Clasificación de los sistemas de descontaminación de canales

Varios estudios realizados por distintos autores han evaluado la eficacia de diferentes tratamientos de descontaminación, incluyendo la depilación química, expurgo con cuchillo, lavado de la canal, aplicación de vapor a presión subatmosférica, vapor caliente, o combinación de dos o más tratamientos de descontaminación secuenciados (Sofos y Smith, 1998; Sofos, 2002; Bosilevac y cols., 2004; Geonaras y Sofos, 2004).

Sofos y Smith (1998), clasificaron los sistemas de descontaminación en dos grandes grupos:

- a. Sistemas de depilación con la ayuda de sustancias químicas.
- b. Sistemas de limpieza en húmedo de canales. Dentro de este apartado están la gran mayoría de tecnologías que se utilizan actualmente en los mataderos norteamericanos.
 - Limpieza de áreas pequeñas mediante el expurgo con cuchillo o aplicación combinada de vapor subatmosferico.
 - Limpieza de la totalidad de la canal mediante lavado con agua, duchado con un desinfectante químico aprobado por la USDA-FSIS y finalmente el aclarado con agua.
 - Lavado de la totalidad de la canal con agua a baja o alta temperatura.
 - Aplicación de vapor a alta presión, vacío y lavado posterior de la canal.

Las industrias cárnicas seleccionan uno u otro método de descontaminación en función del coste, de las necesidades, de la disponibilidad de infraestructura y en función del destino final del producto. Un estudio de investigación realizado en 7 mataderos de los EUA reveló que tras la descontaminación de las canales mediante el sistema en húmedo combinado con desinfectantes orgánicos se alcanzaron reducciones hasta 3 log ufc/cm² de microorganismos patógenos (Sofos y cols., 1999).

3.3. Sistemas de descontaminación ante-mortem

Las superficies externas de los animales, como la piel, pelo o lana son las principales fuentes de contaminación de las canales. Recientemente el interés sobre la posibilidad de

descontaminar estas superficies ha ido creciendo con el fin de reducir los niveles microbiológicos en las partes externas de los animales antes de entrar en el aturdidor y a la vez reducir la contaminación cruzada de las canales durante el procesado (Bacon y cols., 2000; Sofos, 2002). Sin embargo, algunos autores no han encontrado ninguna asociación directa entre la suciedad presente en la piel del ganado vacuno y los recuentos bacterianos en las canales. Además, en un estudio realizado en 6 mataderos de ovejas se observó que las prácticas de manejo que se realizaban antes del sacrificio no causaron mejor efecto en la calidad microbiológica final de las canales (Duffy y cols., 2000).

Algunos autores consideran que con el duchado con agua y sustancias químicas se consigue reducir la contaminación de las superficies externas de los animales, por ejemplo, con cloruro de cetilpiridinio productos clorados, hidróxido sódico, ácido láctico y acético, y etanol (Bacon y cols., 2000; Ransom y cols., 2003; Bosilevac y cols., 2004; Mies y cols., 2004). Sin embargo, la principal preocupación relacionada con el lavado de los animales vivos se centra en la posible diseminación de la materia fecal y de los microorganismos asociados de forma más rápida en los animales vivos mojados (Geonaras y Sofos, 2004).

La implementación del lavado de animales vivos antes del sacrificio en los mataderos está limitada por el clima, el tipo de animales y el tipo de instalaciones. En Nueva Zelanda, el lavado de ovejas vivas es una práctica habitual, y en Australia y algunos mataderos de EUA se aplica con el ganado vacuno (Stopforth y cols., 2002; Geonaras y Sofos, 2004). Sin embargo, atendiendo a la legislación americana, el ganado vacuno debe estar seco o al menos que no goteen líquidos antes del sacrificio (Reed, 1996). Una de las posibles soluciones para minimizar la contaminación cruzada en animales mojados o muy sucios es reducir la velocidad de sacrificio, modificar las fases de sacrificio o instalar equipos necesarios para la limpieza de la piel, y ello implica aumentar el número de trabajadores en la línea de sacrificio o separar los animales más sucios y sacrificarlos al final del faenado (Stopforth y cols., 2002)

El lavado de animales previo al sacrificio no se ha estudiado suficientemente como para sacar conclusiones relevantes en cuanto a su eficacia o ineficacia y su viabilidad de implantación en los mataderos estadounidenses, aunque *a priori* los investigadores apuestan por seguir trabajando y profundizar más para su futura aplicación (Stopforth y cols., 2002).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

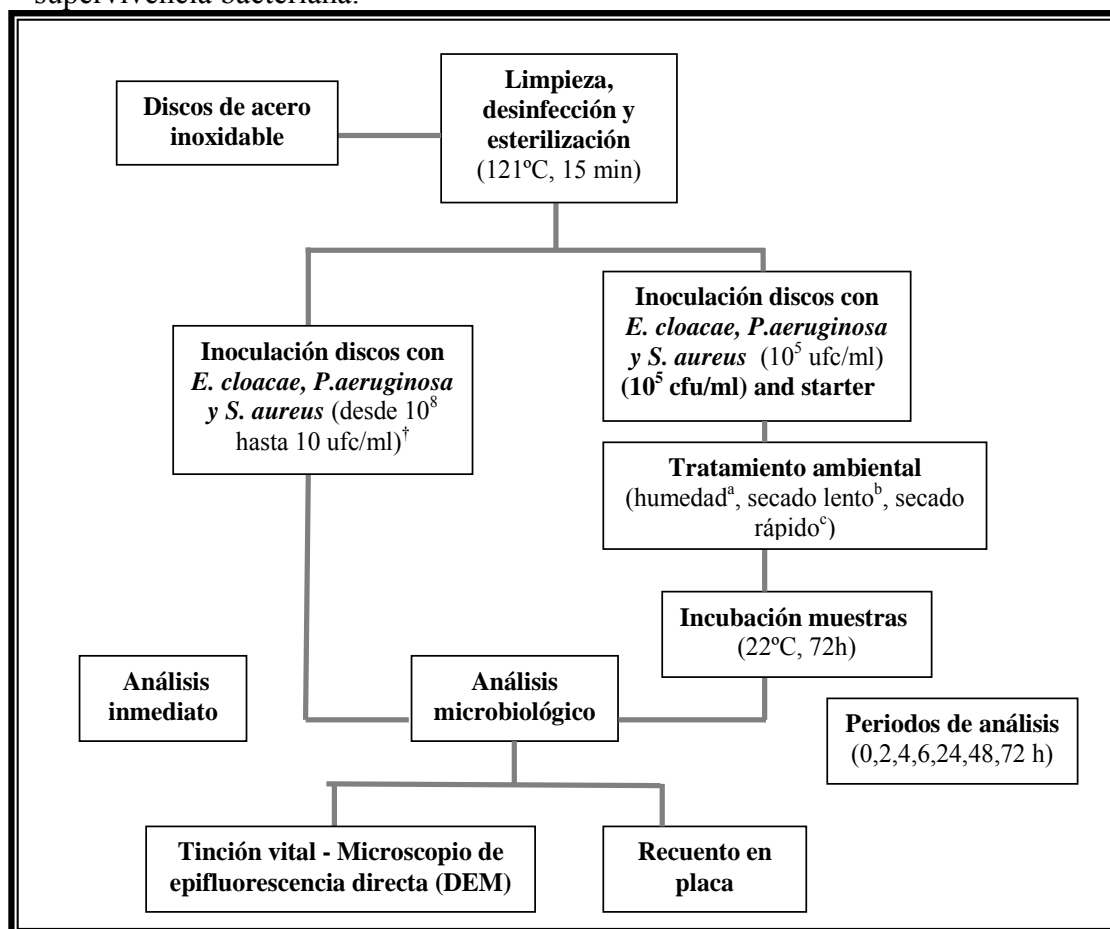
IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Puesta a punto de la técnica de epifluorescencia. Efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia bacteriana

1.1. Diseño experimental

En la **Figura 3**, se muestra el diseño experimental para realizar la puesta a punto de la técnica de epifluorescencia para el control microbiológico de las superficies y su comparativa con los recuentos en placa así como, su aplicación para el estudio del efecto de las condiciones ambientales en la supervivencia bacteriana. Los análisis se realizaron por duplicado y el experimento se repitió tres veces.

Figura 3. Diseño experimental de la puesta a punto de la técnica de epifluorescencia y del estudio del efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia bacteriana.



† Validación del recuento de la técnica DEM

^a Humedad saturada hasta 72h ; ^b Secado a temperatura ambiente hasta 72h; ^c Secado en campana de flujo laminar durante 1h.

1.2. Superficies de evaluación y cepas bacterianas

Se utilizaron discos de acero inoxidable con acabado tipo 304-2b, y de 2 centímetros de diámetro por 1 milímetro de grosor. Eran ligeramente convexos, con una altura máxima, en el centro, de un 1 milímetro. Los discos fueron limpiados con un detergente (Dipol®, Dino, S.L., España) y desengrasados con 70% isopropanol (Panreac, Panreac Química S.A, Montcada i Reixach, España) de acuerdo con el protocolo descrito en la UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002). Posteriormente se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos.

Las cepas de referencia utilizadas fueron:

- *Staphylococcus aureus* CECT 240
- *Enterobacter cloacae* CECT 194T
- *Pseudomonas aeruginosa* CECT 116 5442

Las cepas procedían de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Universidad de Valencia, Valencia, España) y se mantuvieron liofilizadas en viales a temperatura de refrigeración. Las tres cepas bacterianas se revivificaron añadiendo 0,5 ml de agua destilada estéril en cada vial. A continuación se agitó el vial y tras 5 minutos el contenido se depositó en tubos que contenían 10 ml de “Tryptic Soy Broth” (TSB, Difco™, Washington, Estados Unidos de América, EUA), que se incubaron a 37°C durante 18-20h.

La estandarización del inóculo se realizó espectrofotométricamente (Cecil 9000, Reino Unido) a una longitud de onda de 405 nm. Con el objetivo de obtener un inóculo entre 10^8 - 10^9 ufc/ml se aplicó la recta de calibración apropiada para cada cepa bacteriana (Herrador, 2001).

1.3. Tinción vital de fluorescencia

Para la observación de las muestras al microscopio se realizó la tinción vital de fluorescencia (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit L-13152, Molecular Probes, EUA). El kit está compuesto por una mezcla de un colorante verde fluorescente denominado SYTO® 9 y un colorante rojo fluorescente correspondiente al yoduro de propidio. Ambas sustancias se

fijan a los ácidos nucleicos de las células y difieren entre ellos por su espectro de excitación y emisión correspondiente a 480/500 nm para el SYTO[®] 9 (color verde) y 490/635 nm para el yoduro de propidio (color rojo). Su mecanismo de acción se basa en la integridad de membrana. El SYTO[®] 9 es capaz de penetrar en todas las células, tanto si tienen o no la membrana dañada, sin embargo el yoduro de propidio solamente es capaz de penetrar en las bacterias que poseen la membrana dañada. Por lo tanto, las células con la membrana intacta emiten fluorescencia de color verde y las que tienen la membrana dañada emiten fluorescencia roja porque el yoduro de propidio reduce el SYTO[®] 9 cuando los dos están presentes. Para realizar la tinción se preparó una solución base doble concentrada disolviendo los colorantes liofilizados en 5 ml de agua destilada estéril, respectivamente. Posteriormente se mezclaron obteniéndose una concentración de 6 μ M de SYTO[®] 9 y 30 μ M de yoduro de propidio y se dispensaron en viales de 1 ml para conservarse en congelación (-18°C) a oscuras.

1.4. Técnica de microscopia de epifluorescencia directa (DEM)

Todas las muestras fueron teñidas con 50 μ l de LIVE/DEAD[®] y fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia directa Olympus BX51/BX52 (Olympus, Tokio, Japón) con una lámpara de mercurio Olympus U-RFL-T (Olympus) y 3 filtros de excitación (**Tabla 3**).

Tabla 3. Características de los filtros ópticos

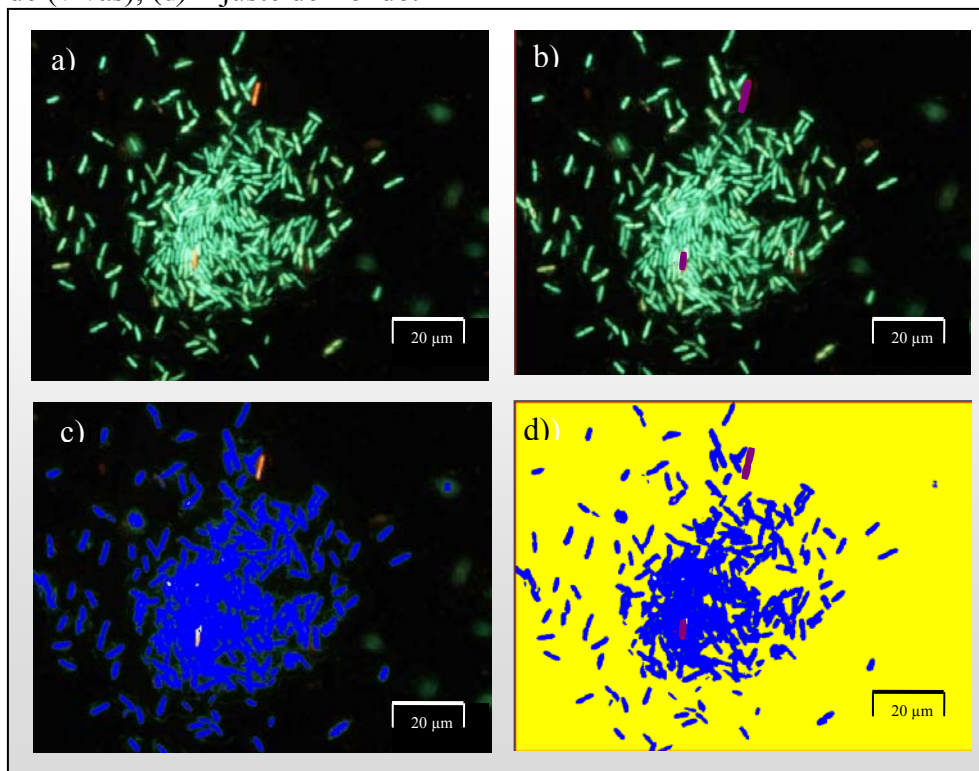
Tipo de filtro	Rango de excitación	Rango de emisión	Color percibido
B	460-490	515-550	Verde
G	510-550	>590	Rojo
IB	480-495/515-535	550-570/590-620	Verde-rojo

1.4.1. Captura, digitalización y análisis de imagen

Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Olympus DP-50. Los parámetros como la configuración de entrada, calibración de la entrada y la adquisición de imágenes se ajustaron a unos valores estándares para conseguir imágenes homogéneas. El análisis de imagen se realizó con el programa Soft Imaging System[®] (analySIS[®] GmbH, Alemania).

La detección y medición de los componentes de la imagen se realizó mediante un parámetro llamado “thresholding” o ajuste de umbral que permitía definir y separar los componentes de la imagen y asignar a cada uno de ellos un color distinto (**Figura 4**). Con ello mediante operadores lógicos se hacía la detección de los componentes marcados para cuantificar el área, el perímetro, el número de partículas, la clasificación de partículas, etc. En todas las imágenes los valores de umbral se ajustaron en el histograma por prueba y error (opción manual) de modo que cada imagen iba definida por 3 niveles de color.

Figura 4. Ajuste de umbral de la imagen (a) Imagen sin tratar, (b) Ajuste de las células teñidas de rojo (muertas/lesionadas), (c) Ajuste de las células teñidas de verde (vivas), (d) Ajuste del fondo.



1.5. Preparación de las muestras y análisis microbiológico

A partir del inóculo inicial de *E. cloacae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* se realizaron diluciones decimales seriadas en “Buffered Peptone Water” (BPW, BioMérieux, Marcy l’Etoile, Francia).

1.5.1. Validación del recuento de la técnica DEM

Para realizar la validación entre el recuento en placa y la cuantificación de bacterias mediante análisis de imagen se tomó una alícuota de 50 µl de cada dilución bacteriana y se depositó en el centro de la superficie de los discos, se tiñeron e inmediatamente se examinaron en el microscopio, siguiendo las especificaciones mencionadas en el apartado 1.4. En paralelo se realizó el recuento de los inóculos en medio “Plate Count Agar” (PCA, Difco™) y se incubaron durante 24-48h a 30°C.

1.5.2. Efecto de las condiciones ambientales

Para la evaluación del efecto del ambiente sobre la supervivencia bacteriana, se depositó una alícuota de 50 µl de la dilución con una concentración bacteriana aproximada de 10^5 ufc/ml equivalente a 10^2 - 10^3 ufc/disco. Posteriormente, las muestras se incubaron en ambientes distintos a 22°C durante 72 horas. Las condiciones fueron las siguientes:

- *Condiciones húmedas*: incubación de los discos sobre un lecho papel de filtro mojado con agua depositado en una caja cerrada con la finalidad de mantener una humedad relativa alta.
- *Condiciones de secado lento*: incubación de los discos en la estufa, en estas condiciones se pretendía la desecación progresiva del inóculo bacteriano
- *Condiciones de secado rápido*: previa a la incubación en estufa, los discos se introdujeron en una campana de flujo laminar (Testar BIO-II-A, Terrasa, España), durante 1 h, para favorecer la desecación rápida del inóculo y permitir la adhesión en la superficie del disco de las bacterias.

Durante este período de incubación, se determinó el recuento bacteriano mediante análisis de imagen y recuento en placa en diferentes intervalos de tiempo: 0, 2, 4, 6, 24, 48, y 72 h. En cada intervalo de tiempo se analizaron 2 discos de cada cepa y ambiente. Uno para determinar

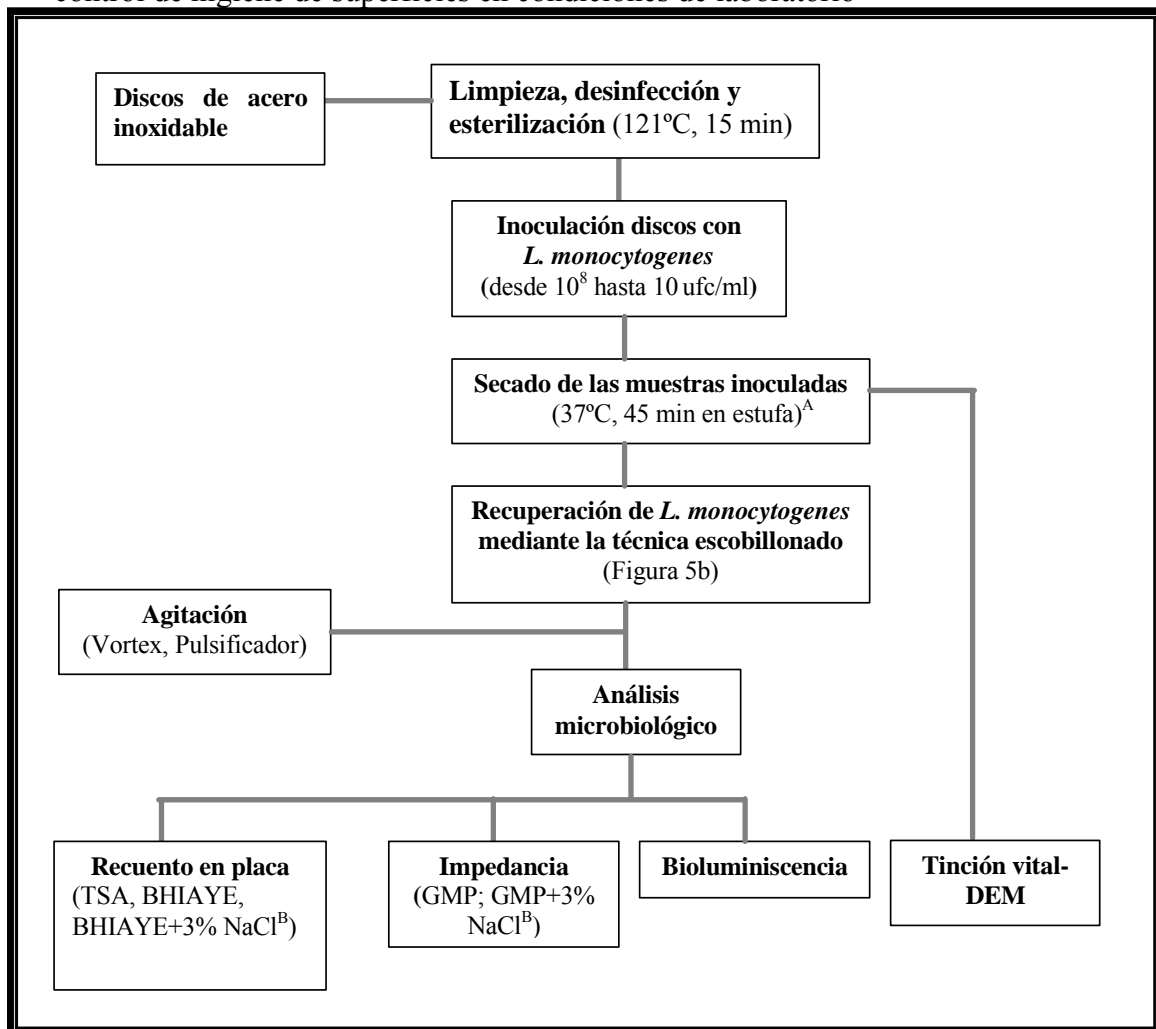
el recuento en PCA incubado a 30°C durante 24-48 h. Y el otro se tiñó con LIVE/ DEAD[®] y se examinó mediante la técnica DEM.

2. Comparación de métodos rápidos y tradicionales para evaluar la higiene en superficies: estudio a nivel de laboratorio

2.1. Diseño experimental

En las **Figuras 5a** y **5b**, se muestra el diseño experimental para realizar la comparación de métodos tradicionales y rápidos para evaluar la higiene en superficies. Los análisis se realizaron por duplicado y el experimento se repitió tres veces.

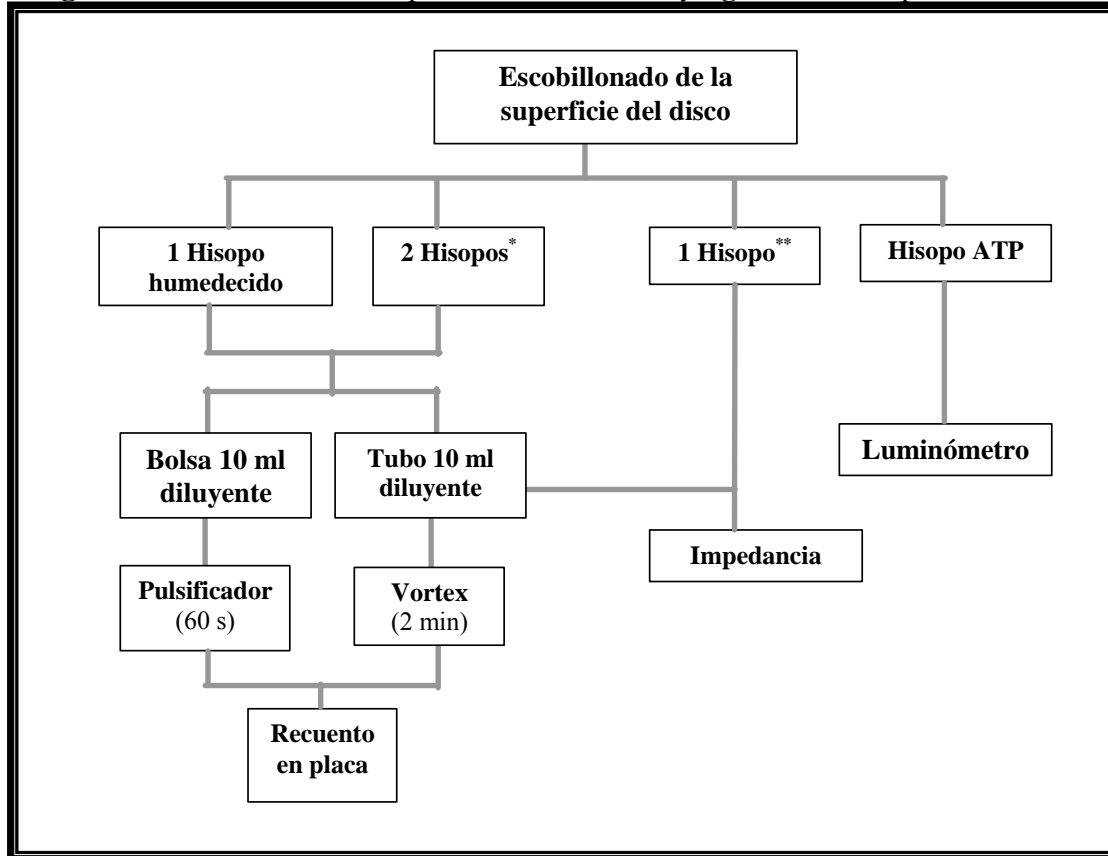
Figura 5a. Diseño experimental del estudio de comparación de métodos de control de higiene de superficies en condiciones de laboratorio



^A UNE-EN 13697

^B Determinación de bacterias lesionadas. Experimento realizado 2 veces.

Figura 5b. Protocolo de recuperación de *L. monocytogenes* de la superficie.



*Primer escobillado con hisopo humedecido y el segundo con hisopo seco

**Análisis directo del hisopo

2.2. Superficies de evaluación y preparación del inóculo

Se utilizaron discos de acero inoxidable con las mismas características descritas en el apartado 1.2.

La cepa utilizada fue *Listeria monocytogenes* Scott A procedente del Instituto de Investigaciones Agrarias (INIA) de Madrid conservada en criobolas (Nalgene System 100™ Laboratories Microkit Iberica S.L., Madrid, España) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cepa se recuperó en TSB incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Se realizó la siembra en estría en medio “Tryptic Soy Agar” (TSA; Difco™) y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 h. A partir de este cultivo se preparó la suspensión inicial en un frasco que contenía 10 ml de diluyente (0,85% NaCl [Panreac], y 0,1% de triptona [Difco™]) y 5 g de perlas de vidrio. El contenido del frasco se agitó durante 3 minutos utilizando un agitador mecánico (Vortex®). Esta suspensión se estandarizó mediante espectrofotometría (apartado 1.2.).

2.3. Preparación de las muestras y análisis microbiológico

A partir del inóculo inicial de *L. monocytogenes* (10^9 ufc/ml aproximadamente) se realizaron diluciones decimales seriadas en tubos de 9 ml con diluyente. Se inoculó 0,1 ml de cada dilución con una concentración aproximada de 10^8 hasta 10^9 ufc/ml en la parte central de la superficie del disco y se incubaron a 37°C durante 45 minutos en una estufa (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España) para permitir el secado y la adhesión de *L. monocytogenes* siguiendo, las indicaciones de la norma UNE 13697 (Anónimo, 2002).

2.4. Tinción vital LIVE/DEAD® y técnica DEM

La determinación se realizó según el protocolo descrito en el apartado 1.3 y 1.4. Para calcular el recuento de células se tomó en consideración un área total de 0,3 mm² equivalente a 15 campos con una magnificación de 1000. A partir del área ocupada por bacterias, se calculó el número de células bacterianas, teniendo en cuenta que el tamaño medio de las bacterias era de 0,90 μm². Los resultados se expresaron en número de células/cm².

2.5. Técnica de bioluminiscencia

Para la recuperación del ATP libre y presente en el interior de las células se utilizaron hisopos CLEAN-TRACE Rapid Cleanliness Test UXL100 (Biotrace, Reino Unido) humedecidos con un agente catiónico. Cada superficie se escobillonó en dos direcciones en un ángulo de 90° cada una. La posición del hisopo respecto a la superficie tenía una inclinación de aproximadamente 45° para ejercer el mismo grado de presión en toda el área.

En el mercado se pueden encontrar distintos equipos pero se eligió este porque en un trabajo previo de comparación de equipos, se observó que en términos de reproducibilidad y nivel de detección todos eran parecidos, pero este además era fácil de usar y transportar (Griffith y cols., 1997).

Para determinar la cantidad de ATP, se siguieron las instrucciones del fabricante (Biotrace) y se midió en el luminómetro UNI-LITE Xcel XCE V3.0A (Biotrace) (**Figura 6**). El resultado se expresó en Unidades Relativas de Luz (RLU).

Figura 6. Protocolo escobillonado mediante la técnica bioluminiscencia.



2.6. Técnica de escobillonado

Para realizar el escobillonado de los discos se utilizaron hisopos de algodón estériles (IASA, Barcelona, España), humedecidos con diluyente (0,85% NaCl, y 0,1% de triptona).

Para determinar el mejor método de recuperación mediante escobillonado se realizó la comparación del porcentaje de recuperación de *L. monocytogenes* mediante la técnica de escobillonado con un hisopo previamente humedecido y con 2 hisopos, el primero humedecido y el segundo seco. Además para optimizar el proceso de recuperación de las bacterias adheridas al escobillón se emplearon dos métodos de homogenización. Así tras escobillonar la superficie, los hisopos se introdujeron en un tubo con diluyente y en una bolsa de estomacher con 5 ml de diluyente. Se homogenizaron con un agitador mecánico Vortex durante 2 minutos y en un homogenizador de ondas de vibración a alta frecuencia (Pulsifier[®], Biotrace) durante 60 segundos.

El análisis microbiológico se realizó mediante recuento en placa en medio TSA. Los discos, también se sembraron una vez escobillonados. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48h.

2.7. Técnica de impedancia

Para realizar el escobillonado de los discos se utilizaron hisopos de algodón estériles (IASA, Barcelona, España), humedecidos con diluyente (0,85% NaCl, y 0,1% de triptona).

En la aplicación de esta técnica se utilizaron 2 protocolos. El protocolo 1 consistió en un hisopado de las superficies, seguido de la homogenización del hisopo en el tubo y se inóculo 1 ml en los módulos previamente llenados con 1 ml de General Purpose Medium” (GPM, bioMérieux). El protocolo 2 consistió en hisopar la superficie, cortar el hisopo justo por el extremo recubierto de algodón e introducirlo directamente dentro de los módulos previamente llenados con 2 ml de GPM.

Los cambios de impedancia o resistencia del medio de cultivo debido al crecimiento de microorganismos se midieron de forma automática con el Bactometer™ (bioMérieux Vitek, Inc., EUA).

2.8. Determinación de la presencia de células lesionadas

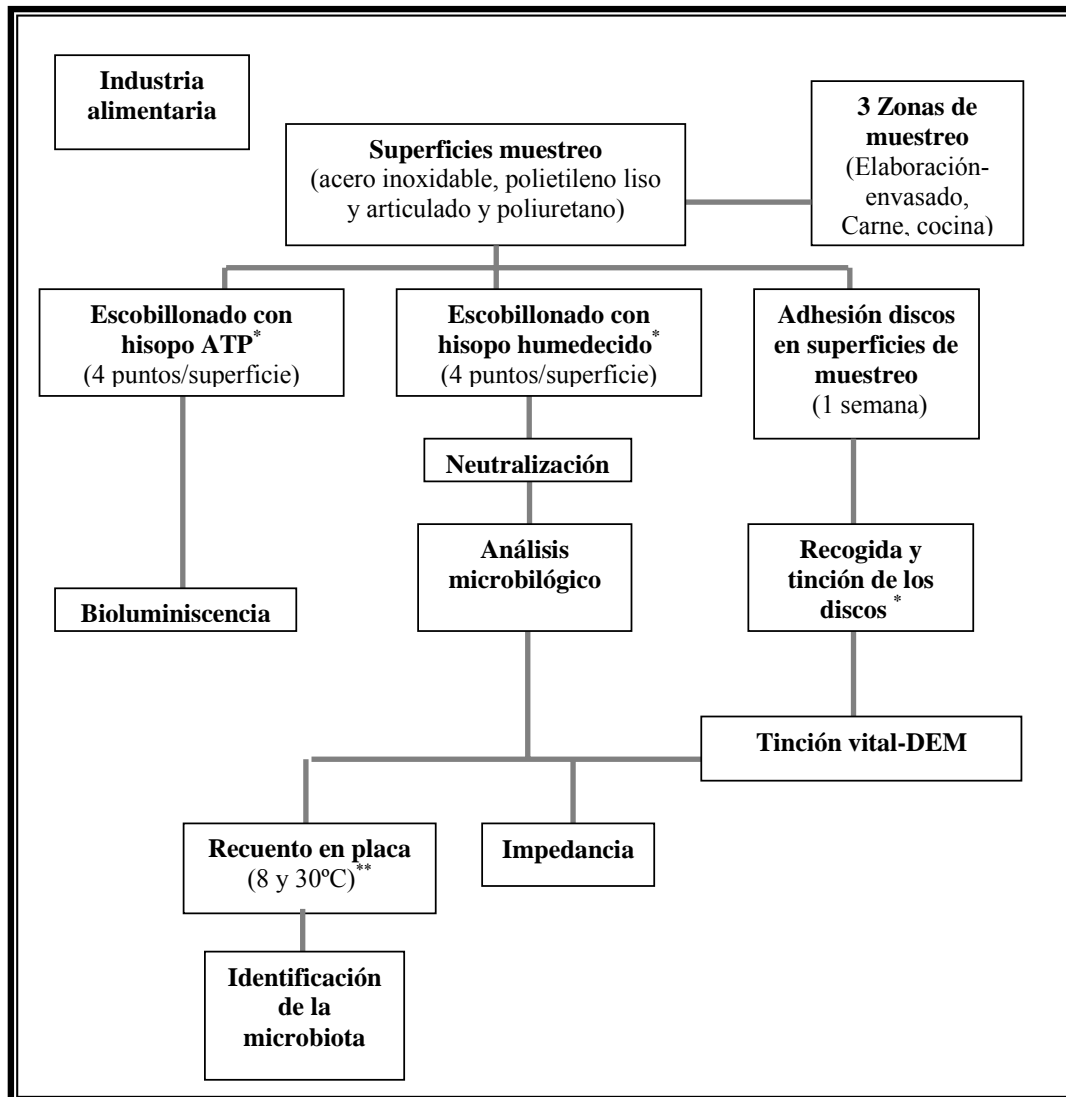
Los discos se escobillonaron con un hisopo humedecido, se introdujeron en un tubo con 5 ml de diluyente y se homogenizaron durante 2 min con el agitador mecánico. Posteriormente se sembraron en “Brain Heart Infusión Agar” (BHIAYE, Difco™) suplementado con 0,6% de “Yeast extract” (YE, Difco™) y en BHIAYE suplementado con 3% de NaCl, concentración sugerida por Patterson (1995) con el fin de detectar bacterias de *L. monocytogenes* lesionadas. También se añadió medio BHIAYE en los discos escobillonados. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48h. Paralelamente, para la técnica de impedancia se inóculo 1 ml del diluyente homogenizado en el módulo previamente llenados con GPM y GPM suplementado con un 3% de NaCl.

3. Verificación de la limpieza y desinfección de una industria alimentaria mediante diferentes métodos de control

3.1. Diseño experimental

En la **Figura 7**, se muestra el diseño experimental para realizar la comparación de métodos rápidos y tradicionales, para verificar la eficacia del programa de higienización de una industria alimentaria. Los análisis se realizaron por duplicado y el experimento se repitió tres veces.

Figura 7. Diseño experimental del estudio comparativo de métodos rápidos y tradicionales para verificar el programa de higienización de una industria alimentaria.



* Muestreo de las superficies después de la limpieza y desinfección

** 30°C recuento de aerobios mesófilos y 8°C recuento de psicótrofos

3.2. Características de la industria alimentaria

El control microbiano de superficies se realizó en una industria de alimentos congelados ubicada en la provincia de Barcelona que produce más de 350 productos distintos. La fábrica esta dividida en tres zonas completamente independientes donde se procesan diferentes productos congelados desde pescado hasta platos precocinados (**Tabla 4**).

Tabla 4. Características de la instalación y del proceso de la industria estudiada.

Zona	Proceso	Temperatura
Carne	Recepción de materia prima fresca, corte, congelación, envasado, encajado y almacenamiento.	10-12°C
Elaboración- envasado	Recepción de materia prima congelada (pescado sin cabeza y sin tripas), corte en rodajas, glaseo, envasado, encajado y almacenamiento producto final.	10-12°C
Cocina	Recepción de materias primas (refrigeradas y congeladas), acondicionamiento, cocción, emplatado, congelado, envasado, encajado y almacenamiento producto final.	18-20°C

3.3. Superficies de trabajo

Se tomaron muestras de 24 superficies de trabajo constituidas por diferentes materiales (acero inoxidable, polietileno liso, polietileno articulado y PVC (cloruro de polivinilo)/poliuretano y 2 puntos de agua de las glaseadoras (**Tabla 5**). Los puntos de muestreo se eligieron teniendo en cuenta la ubicación, el tipo de material y el nivel de riesgo microbiológico. En la **Figura 8** se muestran las imágenes de superficies de cada una de las zonas evaluadas.

Tabla 5. Identificación de las superficies de trabajo estudiadas.

Zona	ID	Superficie	Material
Carne	1	cinta salida túnel congelación	polietileno articulado
	2	cinta envasadora 1	PVC/Poliuretano
	3	mesa de despiece grande	polietileno liso
	4	mesa de despiece pequeña	polietileno liso
	5	mesa despiece con cajones	polietileno liso
	6	sierra sala despiece	acero inoxidable
Elaboración- envasado	7	bañeras cefalópodos	acero inoxidable
	8	Cinta llegada glaseadora	polietileno articulado
	9	cinta a túnel de secado	polietileno articulado
	10	cinta alienación	polietileno articulado
	11	cinta recogida producto sierra	polietileno articulado
	12	cinta salida túnel secado	polietileno articulado
	13	cinta a glaseadora grande	polietileno articulado
	14	cinta a glaseadora pequeña	polietileno articulado
	15	Cinta envasadora 1	PVC/Poliuretano
	16	Cinta envasadora 2	PVC/Poliuretano
	17	maquina lavado cefalópodos	acero inoxidable
	18	mesa manipulación 1	polietileno liso
	19	mesa manipulación 2	polietileno liso
	20	mesa manipulación 3	polietileno liso
	21	sierra de corte pescado	acero inoxidable
Cocina	22	mesa microondas	acero inoxidable
	23	mesa preparación ingredientes	acero inoxidable
	24	mesa emplatado 1	acero inoxidable
	25	mesa emplatado 2	acero inoxidable
	26	mesa emplatado 3	acero inoxidable

Figura 8 (a) y (b): mesa de manipulación de polietileno liso y la cinta de alineación de polietileno articulada ubicadas en la zona de elaboración y envasado; **(c) y (d):** mesas de despiece de polietileno liso y acero inoxidable y a la cinta ULMA de polietileno liso ubicadas en la zona de carne; **(e) y (f)** mesas de emplatado de acero inoxidable la mesa de preparación de ingredientes de acero inoxidable ubicadas en la zona de la cocina.



3.4. Plan de muestreo

El muestreo de superficies se realizó tras la limpieza y desinfección de toda la planta. El horario de toma de muestras fue entre las 4 y 6 de la madrugada. El plan de limpieza llevado a cabo por la empresa se detalla en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Programa de limpieza y desinfección aplicado a las zonas de trabajo.

Zona	Detergente	LIMPIEZA			Tipo de desinfectante	DESINFECCIÓN		
		Concentración	Aplicación	Enjuague		Concentración	Aplicación	Enjuague
Carne	Alcalino	3%	Espumado	(+)	H ₂ O ₂ 50% **/ AgNO ₃ 0,065%	3%	Satélite	(-)
Elaboración-	Alcalino	3%	Espumado	(+)	Alcohol Isopropílico	3%	Satélite	(-)
Envasado	Alcalino	1%	Espumado	(+)	Hipoclorito Na -25%	1%	Pulverizado	(-)
Cocina	Alcalion	3%	Espumado	(+)	H ₂ O ₂ 50%*/ AgNO ₃ 0,065%**	3%	Satélite	(-)

*Peróxido de hidrógeno, **Nitrato de plata.

Se realizaron dos planes de muestreo, con el primero se pretendía evaluar la eficacia de la limpieza y desinfección a lo largo de una semana. Para ello se utilizaron los discos de acero inoxidable descritos en el apartado 1.2. Se colocaron 2 discos en cada una de las 25 superficies de trabajo seleccionadas (**Figura 9a-f**) y permanecieron en la superficie durante una semana. En ese tiempo, el disco al estar colocado ininterrumpidamente sobre una superficie determinada, se iba a ensuciar, iba a recibir la misma contaminación y se iba a limpiar y desinfectar igual que las zonas colindantes. Una vez transcurrida la semana y tras la higienización los discos se despegaron de las superficies, se introdujeron en una placa de Petri estéril y se transportaron hasta el laboratorio.

Con el segundo plan de muestreo se evaluó el nivel de contaminación de las superficies de trabajo mediante diferentes métodos de control. En cada una de las superficies de trabajo se muestrearon al azar 4 áreas de 100 cm², para realizar el recuento microbiológico en placa y mediante impedancia. Se muestrearon 4 áreas más de 100 cm² contiguas a las anteriores, para realizar la técnica de bioluminiscencia.

Figura 9. Las imágenes ilustran la colocación de los discos de acero inoxidable de forma aséptica. (a) y (b): elaboración-ensasado, (c) (d): carne (e) y (f): cocina.



3.5. Análisis microbiológico de las superficies de trabajo

El análisis microbiológico correspondiente al primer plan de muestro se realizó mediante la observación de los discos con la técnica DEM (apartado 1.5.), previamente teñidos con LIVE/DEAD[®] (apartado 1.4.). El área total así como el área ocupada por bacterias verdes (viables) y rojas (lesionadas y/o muestras) se procesó y analizó igual que en el apartado 2.4.

En el segundo plan de muestreo se aplicó la técnica de escobillado. Los hisopos se introdujeron en un tubo con 5 ml de una solución neutralizante descrita por Cogan y cols. (2002) que contenía: 30 g/l Tween 80 (Panreac), 80,3 g/l lecitina (Metarin F Lucas Mayer Hamburgo, Alemania), 1 g/l tiosulfato de sodio (Panreac), 1 g/l triptona (DIFCO), 8,5 g/l cloruro de sodio (Panreac). Se agitaron en un agitador mecánico durante 2 minutos y se realizó la siembra en masa en el medio de cultivo PCA. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 30°C y 8°C durante 48-72 h y 5 días, respectivamente. El recuento microbiano fue expresado en ufc/100 cm².

Para el recuento de bacterias mediante impedancia se inoculó 1 ml de la solución neutralizante en los módulos de del Bactometer[™], que estaban previamente llenados con 1 ml de GPM y se incubaron a 30°C durante 24 horas.

La detección del ATP de las superficies de trabajo se realizó con hisopos CLEAN-TRACE Rapid Cleanliness Test UXL100 (apartado 2.5.).

3.6. Aislamiento e identificación de la flora bacteriana residente

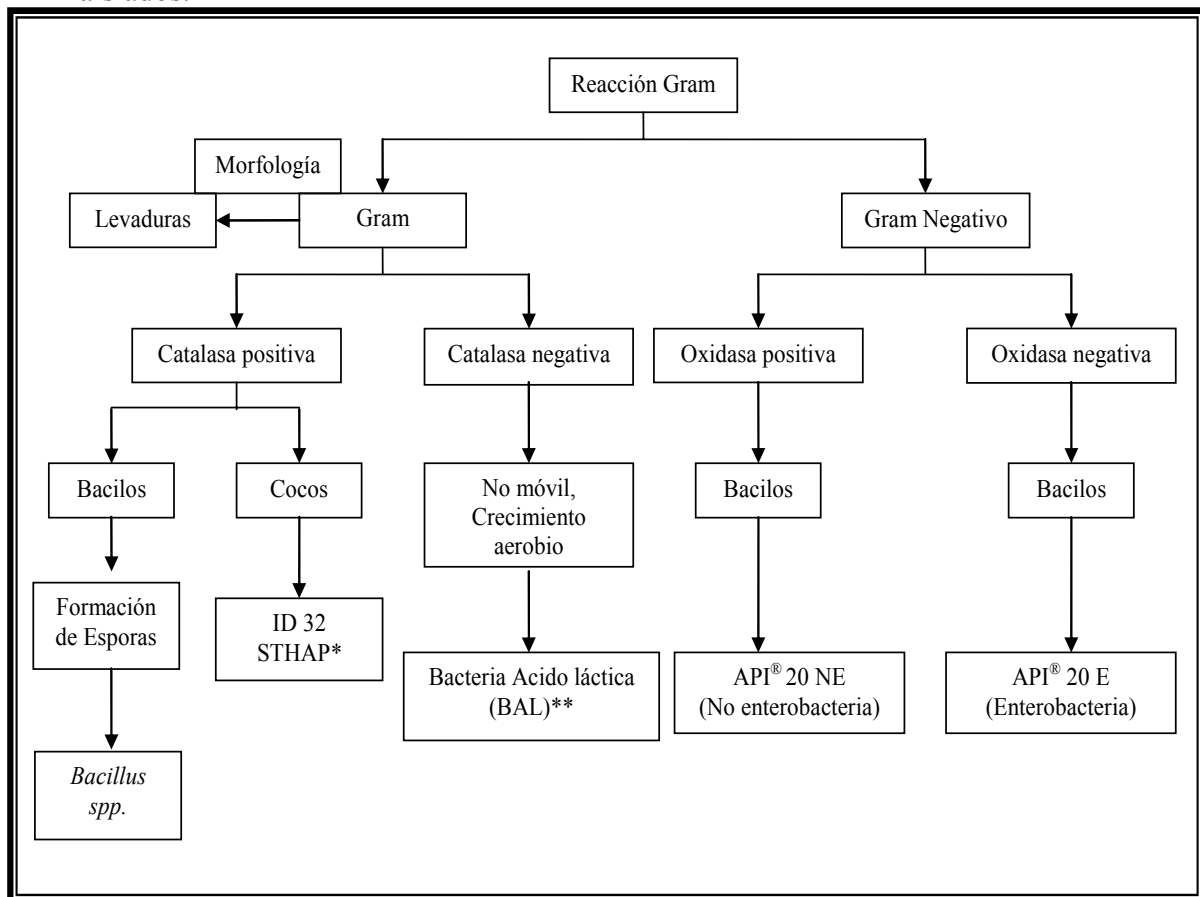
A partir de las placas de PCA con crecimiento microbiano se aislaron, picando al azar, un máximo de 5 colonias de las diluciones más altas y fueron liofilizadas (Liofilizador CRYODOS-50, Telstar, España) para su posterior identificación.

Los aislamientos obtenidos fueron resembrados tres veces en Brain Heart Infusión Agar (BHIA, Difco[™]) y se incubaron a 30°C durante 48 horas, previa reconstitución del liofilizado en tubos con 3 ml de caldo BHI (Difco[™]) a la mitad de la concentración, recomendada por el fabricante. Los tubos se incubaron a 30°C durante 6 horas. Posteriormente se les adicionó 5

ml de caldo BHI a la concentración normal recomendada, y se incubaron nuevamente a 30°C hasta obtener un crecimiento aceptable.

Las colonias de bacterias aisladas y purificadas fueron sometidas a las siguientes pruebas: Gram con hidróxido de potasio (KOH, al 3%), Citocromo-Oxidasa (diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%) y catalasa (peróxido de hidrógeno, H₂O₂, al 3%). Además se observó al microscopio a 1000 aumentos la morfología y motilidad. La **Figura 10** muestra el esquema de clasificación de la flora aislada de las tres zonas de trabajo de la fábrica.

Figura 10. Esquema del sistema de identificación de los microorganismos aislados.



* Identificación de género *Staphylococcus*

**se verificó si producían una bajada de pH<4,5 en el medio MRS modificado

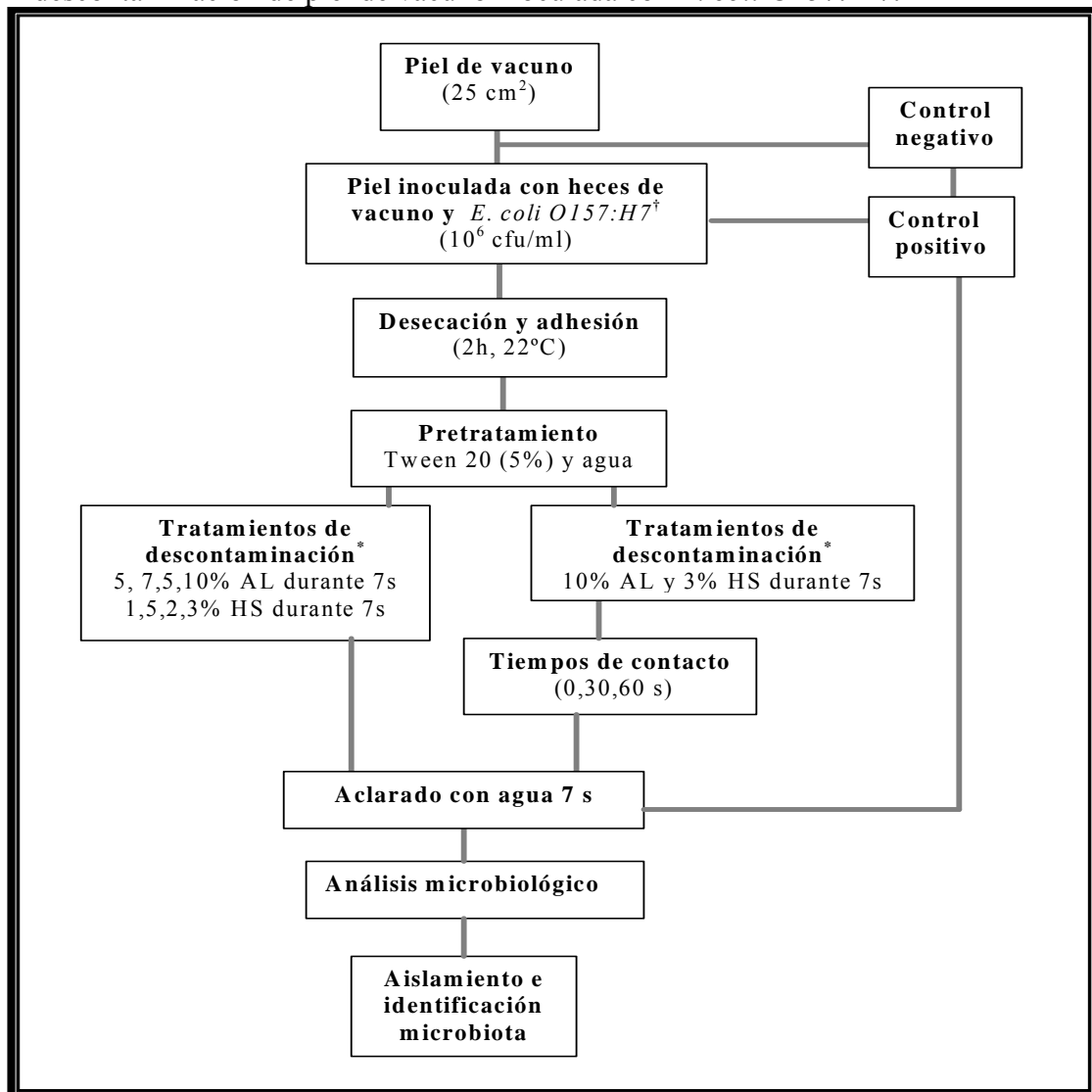
Para las pruebas complementarias se usaron varios sistemas bioquímicos de identificación API (bioMérieux), previamente se prepararon los inóculos a partir de un cultivo de 24 h, del cual se realizó una suspensión bacteriana en cloruro de sodio al 0,85% (bioMérieux) ajustada a una turbidez de 0,5 McFarland con el equipo Densimat (bioMérieux).

4. Aplicación de tratamientos de descontaminación en superficies vivas (piel de vacuno)

4.1. Diseño experimental

En la **Figura 11**, se muestra el diseño experimental para realizar el estudio para evaluar la eficacia la eficacia del Tween 20 combinado con ácido láctico y/o hidróxido sódico para descontaminar piel de vacuno inoculada con *E. coli* O157: H7. Los análisis se realizaron por duplicado y el experimento se repitió tres veces.

Figura 11. Diseño experimental del estudio para evaluar el grado de descontaminación de piel de vacuno inoculada con *E. coli* O157: H7.



AL: ácido láctico; HS: hidróxido sódico

† Mezcla de 5 cepas salvajes de *E. coli* O157:H7

* El ácido láctico (AL) se aplicó a 55°C y el hidróxido sódico (HS), Tween 20 y agua a 23°C.

4.2. Obtención de las muestras y preparación del inóculo

El estudio se realizó con muestras de piel de vacuno. La piel procedía de un matadero con sala de despiece localizado a unos 60 km de Fort Collins (Colorado, EUA). Se cortó en piezas equivalentes a una superficie de 25 cm².

El inóculo se preparó mezclando 5 cepas de *E. coli* O157:H7 resistentes a la Rifampicina (100 µg/ml, RIF, Sigma, Sant Louis, EUA). Inicialmente estas cepas fueron aisladas de materia fecal de origen bovino y fueron conservadas en caldo TSB (Difco™) con un 25% de glicerol a -70°C. Las cepas se revivificaron en TSA (Difco™) con rifampicina (100 µg/ml) y se incubaron a 35°C durante 48h. Tras la incubación se sembró una colonia de cada cepa en TSB con 100µl de rifampicina. Posteriormente fueron subcultivadas tres veces incubándose a 35°C durante 24h. De cada una de las cepas subcultivadas se tomaron 2 ml y se depositaron en un tubo de ensayo obteniéndose un volumen total de 10 ml de inóculo.

El caldo de heces se preparó mezclando 50 g de heces frescas de ganado bovino con 50 ml de agua destilada y a esta mezcla se le añadió el inóculo y se homogenizó.

Las muestras de piel se contaminaron con el caldo alcanzando una concentración aproximada de *E. coli* O157: H7 de 10⁶ ufc/cm². Una vez inoculadas se mantuvieron en una cabina de flujo laminar a 25°C durante 120 minutos para permitir la adhesión del microorganismo patógeno.

4.3. Preparación y aplicación de las soluciones de descontaminación

A partir de una solución de ácido láctico concentrada al 88% (AL, Purac® FCC 88; Purac America, Lincolnshire, IL, EUA) se prepararon tres soluciones de 2 litros a distintas concentraciones: 5% (pH=1,84), 7,5% (pH=1,72) y 10% (pH=1,68).

A partir de una solución de hidróxido sódico concentrada al 100% (HS, Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA) se prepararon tres soluciones de 2 litros a distintas concentraciones: 1,5% (pH=12,48), 2% (pH=12,53) y 3% (pH=12,56).

A partir de una solución de Tween 20 al 100% (TW20, Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA) se preparó una solución de 2 litros del mismo a una concentración de 5% (pH=4,75).

4.4. Tratamientos de descontaminación

Se adoptó el protocolo de descontaminación de canales aplicado en EUA desde 1996 y regulado por la “Food Safety Inspection Service” (FSIS) que consiste en la aplicación de una sustancia descontaminante autorizada como el ácido láctico y el hidróxido sódico, durante 7 segundos seguido de un aclarado con agua durante 7 segundos. El duchado de animales vivos en EUA sigue en fase de estudio a diferencia de otros países como Nueva Zelanda que ya lo tiene implantado en ovejas (Mies y cols., 2004). Además se evaluó el efecto sinérgico del Tween 20 aplicado durante 7 segundos como tratamiento previo al desinfectante. Para simular estas condiciones se rociaron las muestras de piel con los siguientes tratamientos:

- agua a 23°C (Control)
- agua a 23°C más ácido láctico (Taylor y cols., 1999) a 55°C
- agua a 23°C más hidróxido sódico (1,5, 2 y 3%) a 23°C
- Tween 20 al 5% a 23°C
- Tween 20 al 5% a 23°C más ácido láctico (Taylor y cols., 1999) a 55°C
- Tween 20 al 5% a 23°C más hidróxido sódico (1,5, 2 y 3%) a 23°C

4.4.1. Efecto del tiempo de contacto del desinfectante

Para evaluar el efecto del tiempo de contacto de los desinfectantes sobre la piel contaminada con *E. coli* O157:H7 se adoptó el protocolo anterior aunque se aplicaron distintos tiempos de contacto para los desinfectantes: 0, 60 y 120 segundos. Los tiempos fueron elegidos teniendo en cuenta una situación real y adaptable a la cadena de sacrificio de un matadero de grandes rumiantes. La descontaminación se realizó con ácido láctico al 10% e hidróxido sódico al 3% con y sin Tween 20 al 5%.

4.5. Análisis microbiológico

Las muestras tratadas se introdujeron en bolsas de homogenización Whirl-Pak® (Nasco, Fort Atkinson, EUA) que contenían 25 ml de solución neutralizante doble concentrada (NB; Difco™). Y posteriormente se homogenizaron en un homogenizador (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, España) durante dos minutos. Se determinó el pH para verificar la neutralización de las muestras una vez homogenizadas con un pHmetro digital (*UltraBasic*, UB-10; Denver Instrument Arvada CO, EUA) (**Tabla 7**).

Para el análisis microbiológico se tomó una alícuota de 1 ml de cada muestra homogenizada y se introdujo en un tubo con 9 ml BPW (Difco™). Posteriormente se realizaron diluciones decimales y de las diluciones se sembró 1 ml en TSA suplementado con rifampicina para el recuento de *E. coli* O157:H7 y en TSA para el recuento de microbiota acompañante. Las placas se incubaron a 35°C durante 24h.

Tabla 7. Valor de pH de las muestras de piel descontaminadas y neutralizadas.

Tratamiento	Conc.	pH (media ±DE)
Control negativo		7,71 ±0,10
Control positivo		7,77 ±0,07
Agua	21 s	7,83 ±0,05
TW20	21s	7,79 ±0,03
AL	5%	7,28 ±0,27
	7.50%	7,00 ±0,26
	10%	6.92 ±0,30
5% TW20 + AL	5%	7,28 ±0,11
	7.50%	7,29 ±0,11
	10%	7,10 ±0,24
HS	1,50%	8.28 ±0,23
	2%	8.38 ±0,21
	3%	8.85 ±0,33
5% TW20 + HS	1,50%	8.19 ±0,04
	2%	8.31 ±0,09
	3%	8.48 ±0,22

4.6. Identificación microbiana

Se aislaron un número representativo de colonias de las placas de TSA, correspondientes a flora bacteriana de la propia piel, y se resembraron en TSA para obtener cultivos puros.

Las colonias de bacterias aisladas y purificadas fueron sometidas a las siguientes pruebas: Gram con hidróxido de potasio (KOH, al 3%) (Samelis, 2001), citocromo-Oxidasa (diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%), catalasa (peróxido de hidrógeno, H₂O₂, al 3%). Para su clasificación se siguió el esquema presentado en la **Figura 10**. Además en el caso de las bacterias Gram positivas y catalasa positivas, se realizó la tinción de esporas con verde de malaquita (Difco™). Y las catalasa negativas se sembraron en una placa cromogénica para la identificación de estafilococos (BBL™ CHROMagar™ Staph aureus, Becton Dickinson, Sparks, EUA).

5. Análisis estadístico

Para estudio estadístico se utilizó el programa informático SPSS para Windows 95/98/NT/2000, versión 12.1.

Los resultados fueron evaluados por análisis de variancia (ANOVA). Para la comparación de medias se aplicó el test de “Student Newman Keuls” con un nivel de significación $\alpha=0,05$ (Bower, 1997). El análisis estadístico de la variancia de la regresión fue utilizado para la comparación entre las diferentes técnicas analíticas, con el fin de conocer la relación o independencia.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Puesta a punto de la técnica de epifluorecencia. Efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia bacteriana

1.1. Validación de la técnica DEM con el recuento en placa

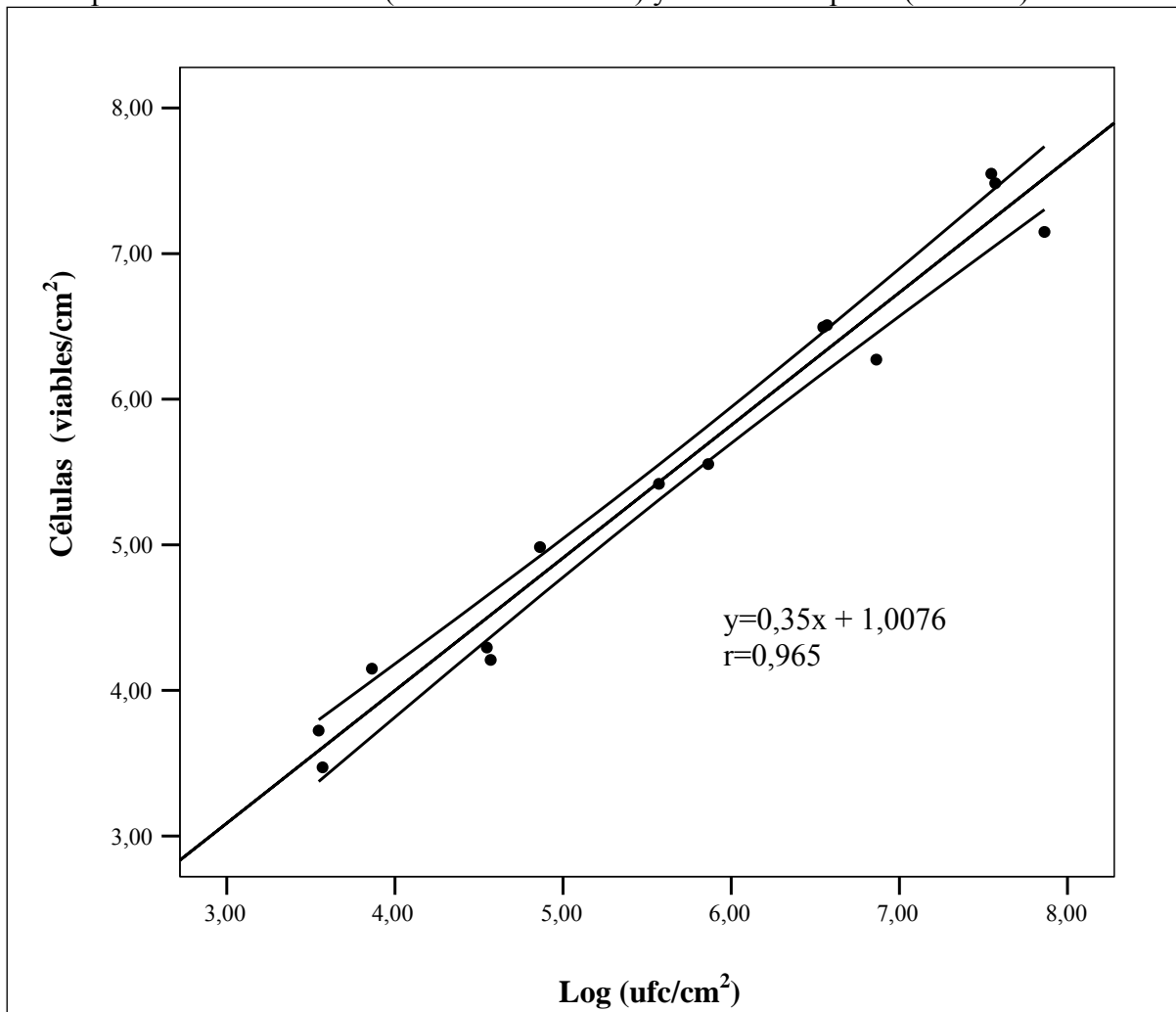
Para determinar la precisión de la técnica DEM se comparó el recuento de *E. cloacae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* evaluados mediante análisis de imagen con el recuento obtenido por el método tradicional de recuento en placa. En dicha comparación, se obtuvo una correlación muy elevada ($r=0,965$; $P<0,01$), pero sólo cuando el recuento se realizó inmediatamente después de la inoculación en los discos y cuando los recuentos estaban comprendidos entre 10^4 – 10^7 ufc/cm² (**Figura 12**). Además, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos obtenidos entre ambos métodos ($P<0,05$). Sin embargo, como veremos posteriormente, cuando los microorganismos fueron sometidos a condiciones ambientales adversas dicha correlación disminuyó significativamente ($r=0,225$ y $P<0,05$). En estas condiciones adversas otros autores también han observado discrepancias entre ambos métodos, siendo los recuentos obtenidos mediante DEM superiores en 2-3 unidades logarítmicas en relación a los obtenidos en placa (Griffiths, 1997; Boulos y cols., 1999). Algunos autores han sugerido que esta diferencia se debe a que los microorganismos sometidos a condiciones ambientales adversas entran en un estado de viables pero no cultivables (VBNC) y por tanto, a pesar de que son bacterias metabólicamente activas no son capaces de crecer en los medios de cultivo (McFeters y cols., 1995; Rose y cols., 2003).

Atendiendo a los resultados obtenidos, la técnica DEM podría utilizarse como herramienta de detección y cuantificación de bacterias viables y lesionadas adheridas en las superficies de la industria alimentaria. Y hasta podría, en algunas ocasiones reemplazar los métodos convencionales dado que en algunas circunstancias éstos infraestiman los recuentos. En consecuencia podría ser un método excepcional de verificación *in situ* de las superficies, haciendo posible la actuación inmediata y la re-limpieza de la superficie sucia antes volver producir. Sin embargo, también presenta ciertos inconvenientes, uno de ellos es que el límite de detección es elevado, concretamente en este estudio fue de $2,79 \log$ (ufc/cm²) ($6,17 \times 10^2$ ufc/cm²). Aunque esta limitación podría mejorarse si se examinaran un mayor número de

campos (Griffiths, 1997). Otro inconveniente es que la técnica DEM requiere personal cualificado para su uso (Boulos y cols., 1999).

También la técnica DEM podría ser una técnica útil para realizar las pruebas de evaluación de la eficacia desinfectante puesto que en estos ensayos se trabaja con inóculos iniciales altos de 8 log ufc/ml con el fin de conseguir una reducción bacteriana del orden de 4 log ufc/ml en los ensayos de eficacia desinfectante en superficies y 5 log ufc/ml en los ensayos de eficacia desinfectante en suspensión (Rossoni y Gaylarde, 2000). Particularmente con los ensayos de eficacia desinfectante en superficie (Anónimo, 2002), la microscopía podría ser una técnica muy útil porque con la ayuda de tinciones vitales se puede observar el nivel de lesión bacteriana “in situ” y por lo tanto el grado de eficacia real de un desinfectante con respecto a los métodos convencionales de recuento en placa (Wirtanen y Salo, 2003).

Figura 12. Recta de regresión lineal del recuento mediante microscopía epifluorescencia directa (células viables/cm²) y recuento en placa (ufc/ cm²).



1.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia bacteriana

1.2.1. Supervivencia de microorganismos en condiciones húmedas

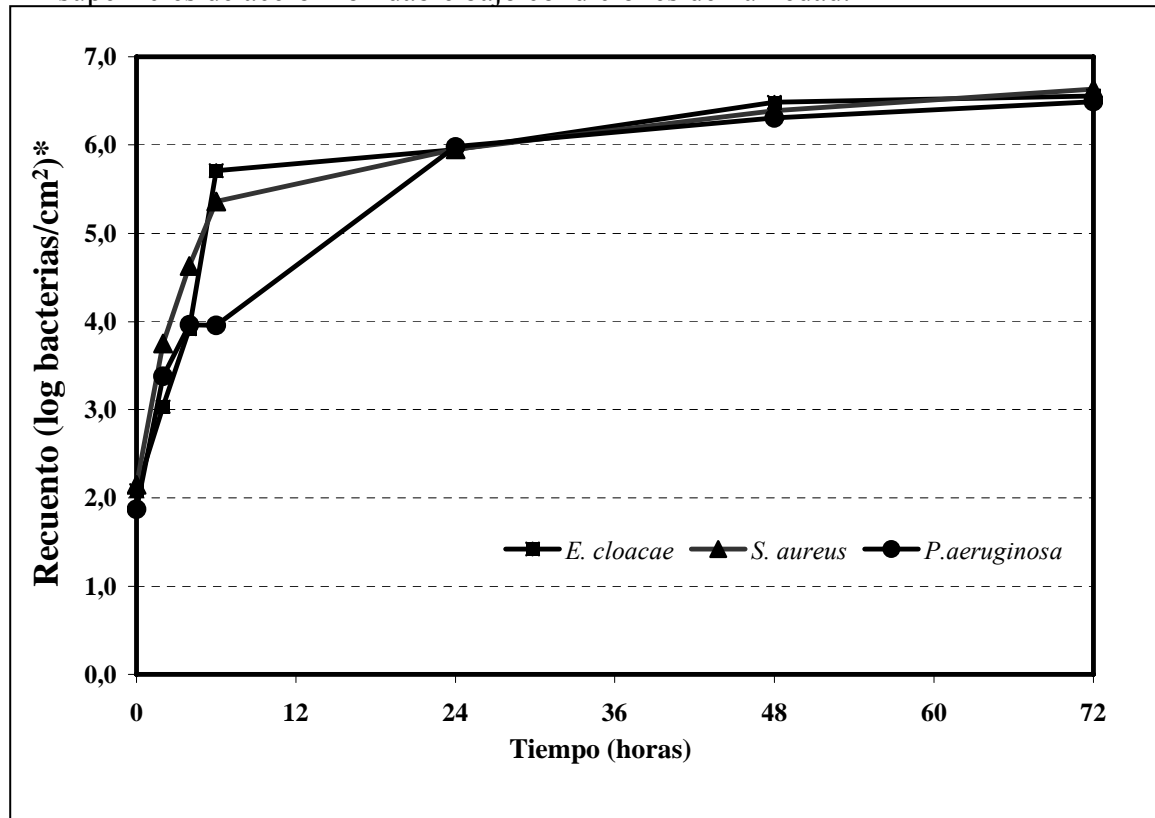
En la **Figura 13** se puede observar la evolución del crecimiento de las tres cepas en condiciones de máxima humedad en las superficies. Los resultados fueron analizados únicamente con DEM, ya que al sembrar el disco directamente en la placa a las 24 h fue imposible realizar su recuento.

Durante las 6 primeras horas, se apreciaron diferencias en el crecimiento de las tres cepas estudiadas ($P < 0,05$). *S. aureus* y *E. cloacae* mostraron una evolución similar aumentando considerablemente ($P < 0,05$) durante las primeras 6 horas, de 2,15 y 2,38 log células/cm² a 5,36 y 5,71 log células/cm², respectivamente. Sin embargo, *P. aeruginosa* aumentó rápidamente ($P < 0,05$) de 1,80 a 3,97 log células/cm² durante las primeras 4 horas, y luego su desarrollo se mantuvo constante hasta las 6 horas.

En la evaluación microscópica también se apreciaron diferencias en el estado en que se encontraban las células. Durante este intervalo de tiempo (0-6 h) la ratio bacterias viables/bacterias totales para *P. aeruginosa* decreció significativamente desde 1 a 0,67, mientras que para las otras cepas la ratio fue igual a 1, es decir no se detectaron células rojas (células lesionadas o muertas).

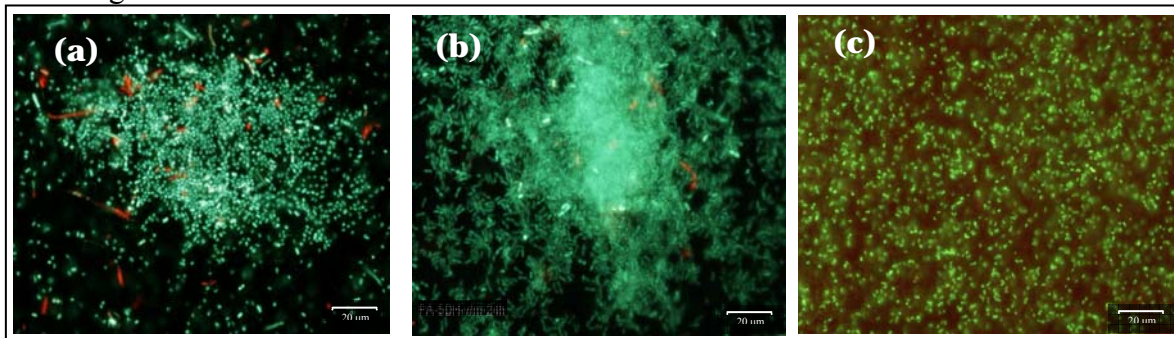
A tiempos posteriores, las tres cepas no mostraron en su crecimiento diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0,05$), alcanzando ya a las 24 horas recuentos próximos a 6 log células/cm² y con una ratio viabilidad/bacterias totales de 0,99-1. En realidad a las 24 horas lo que se observó fue la formación de un biofilm sobre la superficie de los discos de acero inoxidable en las tres cepas estudiadas (**Figuras 14a, 14b, y 14c**).

Figura 13. Evolución de la supervivencia y desarrollo de microorganismos en superficies de acero inoxidable bajo condiciones de humedad.



* Los recuentos a tiempo 0 fueron obtenidos mediante cultivo en placa

Figura 14. Imágenes captadas con un microscopio de epifluorescencia directa y teñidas con Live/Dead[®]. (a) *E. cloacae*; (b) *P. aeruginosa*; (c) *S. aureus*. Las imágenes ilustran un biofilm desarrollado en 24 h en condiciones húmedas.



Cuando se formó el biofilm, se apreció una disminución considerable del diámetro máximo de las bacterias ($P < 0,05$), mientras que no se observaron diferencias estadísticas con el diámetro mínimo (Tabla 8). La reducción del diámetro máximo fue 57%, 57.7% y 31.43% para *E. cloacae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente. Por lo tanto, se observó que el tamaño de las bacterias era más pequeño cuando estaban contenidas en el biofilm respecto a cuando

estaban libres en suspensión. Este fenómeno explicaría porque los microorganismos cuando colonizan superficies húmedas tienen la capacidad de agregarse y crecer formando microcolonias, para ello reducen su tamaño y empiezan a secretar sustancias poliméricas extracelulares hasta formar un biofilm (Midelet y Carpentier, 2002; Chmielewski y Frank, 2003). Algunos autores han demostrado que la producción de polisacáridos de las bacterias Gram negativas se inicia a las 5-6 h tras su adhesión en la superficie (Sharma y Anand, 2002). Esta característica concuerda con nuestros resultados, puesto que *P. aeruginosa* y *E. cloacae* formaron un biofilm antes que *S. aureus* (**Figura 14**). La secreción de exopolisacáridos de las tres cepas fue aumentando a medida que iban creciendo y la ratio de microorganismos viables/totales evolucionó hacia un valor característico de un biofilm maduro compuesto mayoritariamente por más células muertas que vivas. Según, Chmielewski y Frank (2003) los biofilms se desarrollan en áreas húmedas a pesar de que haya poca presencia de nutrientes. En nuestro estudio se confirma, ya que se apreció la formación del biofilm ya a las 24 h, aunque las condiciones de temperatura y nutrientes (agua de peptona) no eran favorables.

Tabla 8. Comparación del tamaño medio (media±desviación estándar) de las bacterias libres y dentro del biofilm mediante análisis de imagen.

Cepa	Diámetro máximo (µm)		Diámetro mínimo (µm)	
	Libre	Biofilm	Libre	Biofilm
<i>E. cloacae</i>	0,73 ^a ± 0,10	0,32 ^b ± 0,04	0,21 ^A ± 0,02	0,20 ^A ± 0,02
<i>P. aeruginosa</i>	0,53 ^a ± 0,05	0,23 ^b ± 0,03	0,21 ^A ± 0,03	0,17 ^A ± 0,05
<i>S. aureus</i>	0,36 ^a ± 0,05	0,24 ^b ± 0,03	0,18 ^A ± 0,03	0,15 ^A ± 0,03

^{a,b} Valores medios de la misma fila con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

^A Valores medios de la misma fila con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Pseudomonas, *Staphylococcus* y *Enterobacter*, se han descrito en la bibliografía como microorganismos capaces de formar biofilms con bastante facilidad. Por ejemplo, la microbiota identificada en la industria láctea con capacidad de formar biofilms incluye a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Staphylococcus*, además de *Bacillus* y bacterias Gram negativas como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Proteus* (Mattila-Sandholm y cols., 1990; Sharma y Anand, 2002). De acuerdo con Moretro y cols. (2003), los resultados obtenidos muestran que los microorganismos patógenos directos u

oportunistas como son *S. aureus*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* pueden desarrollarse y multiplicarse en las superficies siempre que estén húmedas, lo que suponen un peligro potencial de contaminación directa hacia los productos alimenticios, sobretodo si se tiene en consideración que la presencia de microorganismos adheridos en las superficies se transfieren directamente por contacto del alimento con la superficie contaminada (Bagge-Ravn y cols., 2003a). Actualmente hay un gran número de publicaciones que constatan la importancia que tiene la presencia de microorganismos patógenos, ambientales y alterantes en las superficies de procesado y su capacidad de colonizar y desarrollar biofilms cuando las condiciones son favorables (Else y cols., 2003; Reij y Den Aantrekker, 2004).

1.2.2. Supervivencia de microorganismos sometidos a desecación lenta

La evolución observada en las tres cepas estudiadas fue diferente al hacer su evaluación mediante DEM y recuento en placa (**Figura 15**). En los resultados obtenidos por recuento en placa, se apreció que mientras el inóculo era visible en la superficie del disco (0-6 h) el recuento era similar para las tres cepas. Sin embargo, cuando el inóculo se secó (a partir de las 6 h), el recuento de *E. cloacae* y *P. aeruginosa* disminuyó significativamente por debajo del límite de detección de la técnica. Sin embargo, *S. aureus* fluctuó alrededor de 1 log ufc/cm² durante todo el periodo de estudio, indicando que había una población remanente, pero significativa durante los 3 días de estudio. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Kusumaningrum y cols. (2003), en el cual contaminaron superficies de acero inoxidable con diferentes inóculos de *S. aureus* y los sometieron a una desecación lenta. Estos autores observaron que *S. aureus* fue capaz de sobrevivir y detectarse en las superficies durante todo el estudio (96 h). Sin embargo, cuando evaluaron *Salmonella enteritidis* (perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*) observaron que el inóculo inicial de 10² ufc/cm² disminuyó tanto que a las 24 h no obtuvieron ningún recuento.

Respecto a los resultados obtenidos con la técnica DEM, contrariamente a lo observado mediante recuento en placa, se apreció que el recuento de células aumentó considerablemente ($P < 0,05$) durante las primeras 2 h, alcanzando recuentos 3,5 log células/cm², similar a los obtenidos en condiciones húmedas. Posteriormente los recuentos permanecieron constantes hasta las 6 h de incubación (los discos aún se observaban húmedos) (**Figura 15**).

La evolución de las tres cepas fue también diferente a la observada por recuento en placa. Así, *E. cloacae* fue la cepa más susceptible a la desecación ambiental progresiva hasta el punto de que los resultados indicaban que con niveles de contaminación moderada, su presencia disminuía a las 24 h por debajo del límite de detección (**Figura 16a**). Sin embargo las células viables de *P. aeruginosa* y *S. aureus* (células verdes) alcanzaron un recuento de 3,5 log células/cm² a las 24 h (**Figura 15**), y posteriormente disminuyeron por debajo del límite de detección. Al mismo tiempo, el recuento de células lesionadas (células de color rojo) aumentó considerablemente ($P<0,05$) desde las 6 hasta las 24-48 h en las tres cepas estudiadas (**Figuras 16a, 16b y 16c**).

Las diferencias de recuento entre la placa y el microscopio (**Figura 15**) se podrían atribuir a la exposición de factores ambientales adversos, como es el desecado ambiental lento, lesivo y en algún caso mortal para los microorganismos. Estudios recientes, basados en el estrés bacteriano, han demostrado que en las bacterias adheridas a una superficie sometida a un estrés externo como por ejemplo un choque osmótico, térmico o la acción de un antimicrobiano, se produce una pérdida de la capacidad de recuperación del microorganismo en placa (Caro y cols., 1999). Cuando hay un estrés ambiental, una de las alteraciones más comunes que se observa en las bacterias es la afectación de la composición de la membrana plasmática ya que se afecta su permeabilidad (Boulos y cols., 1999). La permeabilidad celular es una característica de la integridad de membrana y se ha demostrado que si está alterada, el microorganismo no es capaz de crecer en un medio de cultivo convencional (Potts, 2001). Por lo tanto el estudio de la integridad de membrana es un punto clave para conocer la viabilidad de los microorganismos. De hecho, Robine y cols. (2002) estudiaron la integridad de la membrana plasmática de *Enterococcus* con el kit LIVE/DEAD[®] Baclight[™] y demostraron que las bacterias teñidas de color verde tenían la membrana plasmática intacta, mientras que las que la tenían dañada se tiñeron de color rojo. Resultados coincidentes con nuestro estudio. No hay que olvidar que el recuento de unidades formadoras de colonias solamente incluye aquellas bacterias capaces de multiplicarse, crecer y formar una colonia en un medio de cultivo en placa (McFeters, 1990). Rose y cols. (2003) observaron que la desecación lenta producida en ambientes altamente húmedos podía ocasionar distorsiones en la estructura proteica de la membrana. La variabilidad en la composición glicoproteica de la membrana entre las bacterias Gram positivas y negativas es la razón por la cual se puede explicar la variabilidad en respuesta a la desecación (Bower y Daeschel, 1999).

Figura 15. Evolución y desarrollo de los microorganismos en superficies de acero inoxidable sometidos a condiciones de desecación ambiental.

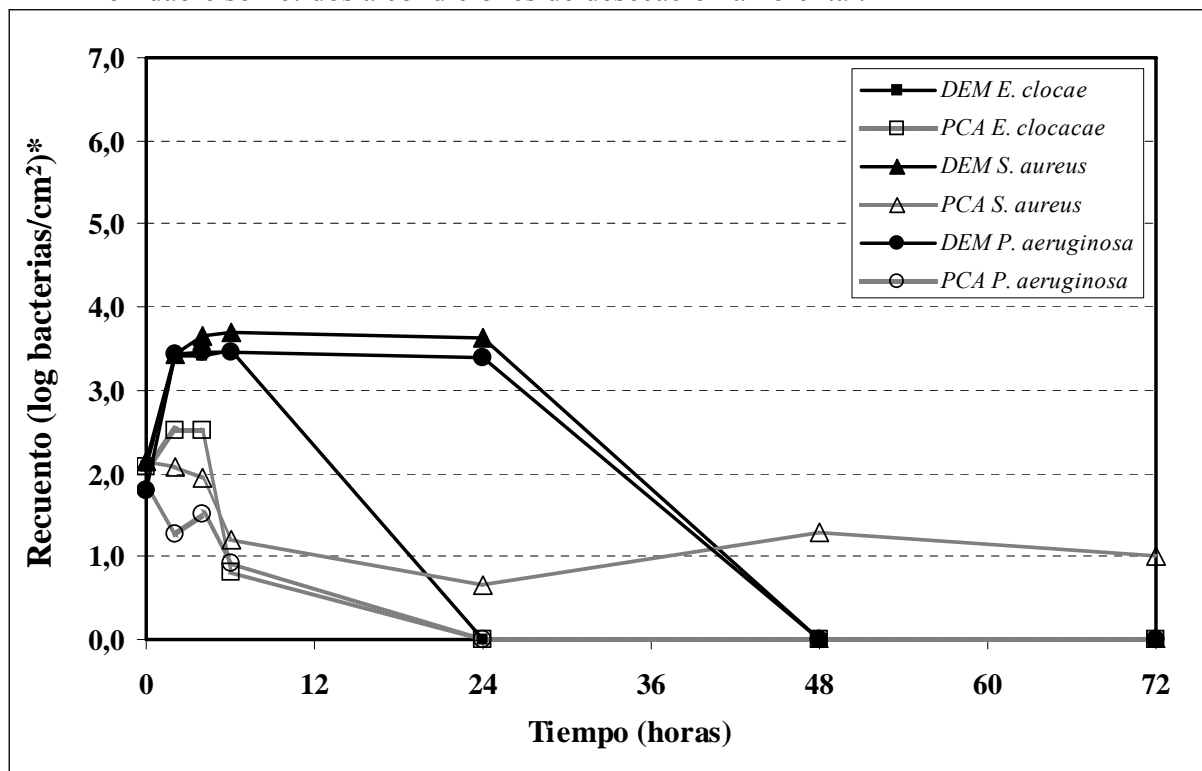
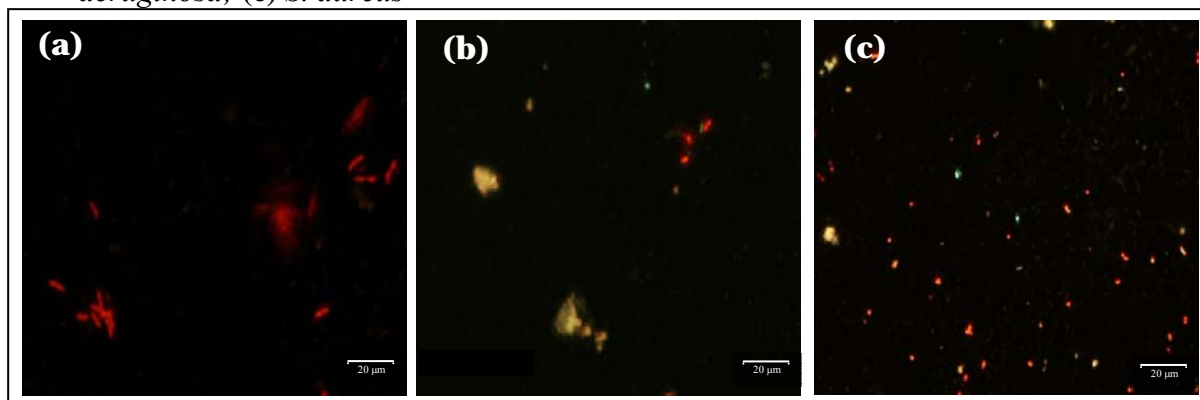


Figura 16. Las imágenes ilustran el efecto de la desecación ambiental a las 24 h sobre el desarrollo y supervivencia de las bacterias. (a) *E. cloacae*; (b) *P. aeruginosa*; (c) *S. aureus*



1.2.3. Supervivencia de microorganismos sometidos a desecación rápida

La aplicación de aire forzado sobre las superficies inoculadas con bacterias fue el tratamiento más efectivo sobre la reducción del inóculo inicial. Los resultados observados en el recuento

en placa indicaron que la supervivencia de *E. cloacae* y *P. aeruginosa* decreció rápidamente durante las 2 primeras horas, con una disminución bacteriana de aproximadamente 2 log ufc/cm². De forma que el recuento se situó por debajo del límite de detección (<1 ufc/cm²) en tan solo 24h tras la inoculación (**Figura 17**). Sin embargo, el recuento de *S. aureus* disminuyó gradualmente durante las primeras 6 horas, pudiéndose detectar durante todo el periodo de estudio (72 h) en las superficies secas (**Figura 17**).

Cuando se hizo la evaluación por DEM, se apreció que ya a las 2h, las células viables de *E. cloacae* y *P. aeruginosa* no eran detectadas. Mientras que sí se detectaron células viables de *S. aureus* en este periodo y hasta las 24h. A las 24 horas se observó un reducido número de células de *E. cloacae* y *P. aeruginosa* con la membrana dañada (células de color rojo) que posteriormente disminuyeron por debajo del límite de detección (**Figura 18a** y **18b**). Sin embargo, el recuento de células dañadas de *S. aureus* fue próximo a 3 log células/cm² durante las primeras 24 h (**Figura 18c**), indicando que había un recuento significativo que permaneció en la superficie, a pesar de que, no se observasen células viables con el microscopio a partir de las 24 h. Esta observación demostró que *S. aureus* fue capaz de sobrevivir como mínimo 72 h en condiciones ambientales desfavorables producidas por un déficit de agua. Sin embargo, las dos cepas que pertenecían al grupo de Gram negativas fueron más susceptibles al secado rápido. Estos resultados sugieren que cuando se produce un estrés bacteriano por un déficit de agua durante un período corto de tiempo, la membrana plasmática de las bacterias puede dañarse de forma irreversible hasta el punto de producirse la muerte celular. Resultados similares encontraron Humphrey y cols. (1995) con *Campylobacter* spp., que observaron que es una especie con una marcada sensibilidad a la desecación. De forma similar, Cox y cols. (1989) observaron que *Listeria* spp. puede perder fácilmente la viabilidad si se expone al secado rápido. En contraposición, en otros estudios realizados con microorganismos patógenos como *Salmonella* demuestran que éste microorganismo es capaz de sobrevivir largos periodos de tiempo cuando hay restos de productos desecados en la superficie (Humphrey y cols., 1995). Este estudio, confirma y demuestra nuevamente la capacidad de supervivencia de algunos microorganismos patógenos como *S. aureus* en superficies de acero inoxidable en ambientes adversos producidos por la desecación incluso cuando el nivel de contaminación existente es moderado (10² ufc/cm²). Este hecho es muy importante dado que la presencia de microorganismos patógenos en superficies constituye un peligro de recontaminación del producto durante un periodo de tiempo considerable.

Además, corrobora que el secado de las superficies tras el proceso de higienización (Wildbrett, 2000) es una medida importante, ya que minimiza la proliferación de la mayoría de bacterias, debido a que el agua es un elemento esencial para la supervivencia, el crecimiento y la posible formación de biofilms. Entre los factores más importantes que afectan la supervivencia de las bacterias en las superficies están las características intrínsecas de los microorganismos y su entorno ambiental (Peng y cols., 2001).

Figura 17. Supervivencia de microorganismos en una superficie de acero inoxidable sometido a condiciones de desecación rápida.

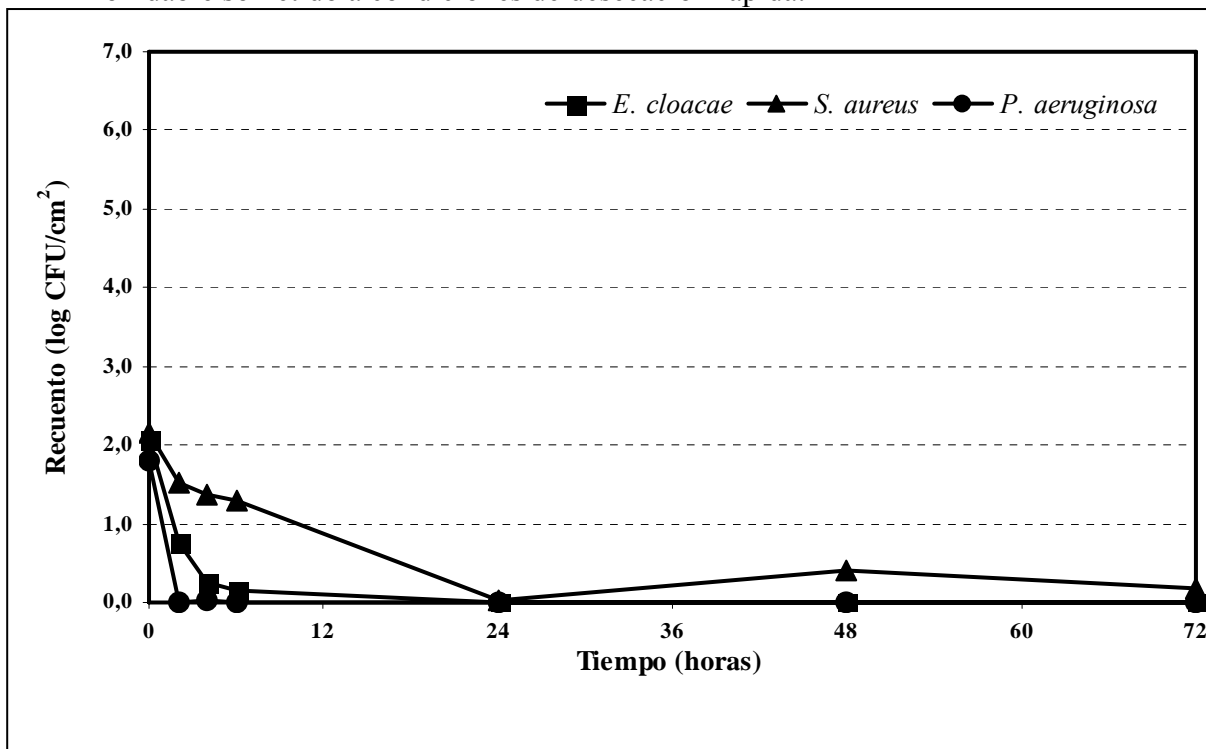
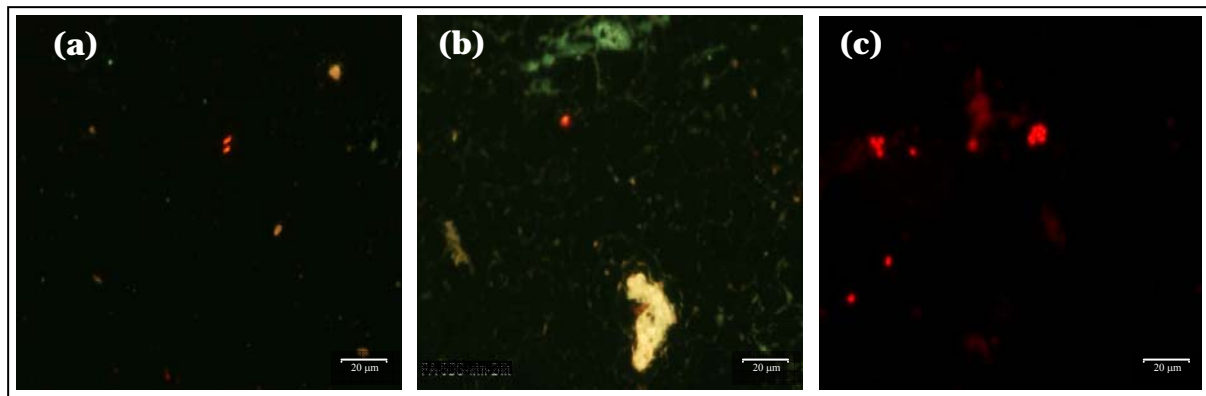


Figura 18. Las imágenes ilustran el efecto de la desecación rápida a las 24 h sobre la supervivencia de las bacterias. (a) *E. cloacae*; (b) *P. aeruginosa*; (c) *S. aureus*.



2. Comparación de métodos rápidos y tradicionales para evaluar la higiene en superficies: estudio a nivel de laboratorio

Los objetivos principales de conseguir estándares altos de higienización en la industria alimentaria son para evitar contaminaciones cruzadas y así mantener la vida útil de los productos alimenticios protegiendo la salud de los consumidores. A pesar de que no existe ningún método ideal de verificación, Griffiths (1997) sugirió que, la combinación de la inspección visual y el análisis mediante métodos microbiológicos y no microbiológicos se puede conseguir un control estratégico e integrado de la higienización en áreas de producción.

2.1. Recuperación de *L. monocytogenes* mediante la técnica de escobillado y recuento en placa

La detección y la enumeración con precisión de los microorganismos que contaminan una superficie mediante la técnica tradicional de escobillado, implican inicialmente, la realización de un buen hisopado de una superficie de área conocida y con una fuerza constante, para asegurar que se desprendan el mayor número de microorganismos y queden retenidos en el hisopo. Posteriormente, es importante agitar para transferir al medio líquido los microorganismos retenidos en el capuchón del hisopo (Moore y Griffith, 2002b). Es por ello, que en este estudio se realizó la comparación del porcentaje de recuperación de *L. monocytogenes* mediante la técnica de escobillado, con un hisopo previamente humedecido y con 2 hisopos, el primero humedecido y el segundo seco. Y la comparación de dos sistemas de agitación: vortex y Pulsifier. La tasa de recuperación se calculó entre el cociente del número de bacterias adheridas en el hisopo y el recuento total (hisopo más bacterias adheridas al disco).

El uso de dos hisopos no fue significativamente mejor ($P \geq 0,05$) que utilizar uno solo, independientemente del inóculo inicial depositado en el disco (**Tabla 9**). Y además, se observó que la agitación con Pulsifier para liberar las bacterias retenidas en el algodón al medio, tampoco fue significativamente diferente al vórtex ($P \geq 0,05$). De modo que con ambos métodos se alcanzaron tasas de recuperación superiores al 98% cuando el nivel de contaminación de las superficies era aproximadamente 1,8 log ufc/disco. Sin embargo con una contaminación inferior, la tasa de recuperación fue disminuyendo apreciándose una

notable dispersión de las medias, con una recuperación aparentemente superior en los valores medios, cuando la agitación u homogeneización se realizó con Pulsifier (**Tabla 9**).

Tabla 9. Tasa de recuperación de *L. monocytogenes* en función del número de escobillonados y el método de agitación (media \pm desviación estándar).

Inóculo inicial Log (ufc/disco)	Tasa recuperación (%)			
	Vortex ^A		Pulsifier ^A	
	1 hisopo	2 hisopos	1 hisopo	2 hisopos
6,64 \pm 0,48	99,92 ^a \pm 0,07	98,48 ^a \pm 1,71	99,66 ^a \pm 0,63	99,98 ^a \pm 0,01
4,98 \pm 0,57	99,77 ^a \pm 0,37	99,77 ^a \pm 0,33	99,77 ^a \pm 0,43	99,90 ^a \pm 0,16
3,85 \pm 0,61	99,38 ^a \pm 0,61	99,65 ^a \pm 0,55	99,25 ^a \pm 1,06	98,47 ^a \pm 3,39
2,95 \pm 0,51	99,69 ^a \pm 0,33	99,87 ^a \pm 0,14	98,21 ^a \pm 3,46	95,81 ^a \pm 8,82
1,84 \pm 0,48	98,03 ^a \pm 2,76	98,59 ^a \pm 1,29	98,04 ^a \pm 3,05	98,09 ^a \pm 1,51
1,11 \pm 0,36	80,31 ^a \pm 21,50	84,05 ^a \pm 14,81	91,72 ^a \pm 10,06	88,24 ^a \pm 10,37
0,92 \pm 0,44	48,45 ^a \pm 29,66	62,06 ^a \pm 22,76	71,62 ^a \pm 32,79	74,43 ^a \pm 17,15
0,79 \pm 0,48	56,35 ^a \pm 26,28	35,71 ^a \pm 27,34	67,99 ^a \pm 29,77	75,89 ^a \pm 16,10

^A Valores medios de la misma fila con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

^a Valores medios de la misma fila con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

La técnica de escobillonado y siembra en placa es una técnica ampliamente utilizada como sistema de verificación de la desinfección en la industria alimentaria, muchos estudios anteriores describen la variabilidad en la recuperación de microorganismos, especialmente en superficies secas (Moore y Griffith, 2002b). Estos autores obtuvieron unos valores de recuperación en una superficie seca inoculada con 3 log ufc/cm², que oscilaron en función de la solución humectante (solución ringer, tampón y tween) aplicada en el hisopo de algodón, entre 80-90%, y en función del material del escobillón (algodón, esponja, dacron y alginato) humedecido con una solución ringer que fue de un 14% (Dacron) y un 85% (esponja). Estos valores son inferiores a los obtenidos en nuestro estudio realizado con un hisopo de algodón humedecido con agua de triptona salina.

De acuerdo con los autores mencionados anteriormente, nuestros resultados indican que la recuperación mediante escobillado de bacterias adheridas a la superficie seca varía significativamente en función de si la contaminación es media-alta ($>1,8$ log ufc/disco) o baja (**Tabla 9**). Estos resultados se pueden explicar ya que las bacterias, especialmente cuando se hallan en un número reducido en una superficie, generalmente se concentran en microrrayas o huecos para protegerse del medio dificultándose su recuperación (Stone y Zottola, 1985). Además Davidson y cols. (1999) sugirieron que la sensibilidad de la técnica de escobillado disminuye en la detección y enumeración de microorganismos básicamente debido a que cuando hay niveles bajos de contaminación los microorganismos tienen más superficie para adherirse. Moore y Griffith (2002b) consideran que el tiempo necesario para que se produzca la adhesión bacteriana en superficies debe ser superior al tiempo aplicado en el proceso de desecación de este estudio (45 minutos). Estos autores realizaron el proceso de desecación a temperatura ambiente durante 1 h, mientras que en el presente estudio la desecación se realizó con aire forzado y a 37°C, proceso que podría acelerar la adhesión bacteriana.

Otro de los factores que intervienen en la mejora de recuperación es la agitación del escobillón en un medio de dilución para aumentar el desprendimiento de las células al medio líquido y separar los agregados bacterianos o biofilms. En función de nuestros resultados, en los que no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ni en función del método (vortex-Pulsifier) ni en el número de escobillados, se puede considerar que la agitación fue efectiva para conseguir la liberación bacteriana del hisopo y que la disminución en la recuperación bacteriana se debe fundamentalmente al proceso de escobillado sobre la superficie.

Hasta la actualidad no existe un protocolo universalmente recomendado en cuanto al tiempo de agitación. Moore y cols. (2001) sugieren que si los escobillones son procesados inmediatamente tras la inoculación, el tiempo de agitación no tiene un efecto significativo en el número de bacterias liberadas al medio desde el hisopo. Sin embargo, en condiciones habituales el procesado de los escobillones no es inmediato, por lo que se consideró en nuestro estudio que dos minutos de agitación podían ser suficientes para asegurar la liberación de las bacterias al medio de dilución. Moore y Griffith (2002a) realizaron un estudio sobre superficies secas, obteniendo una mayor recuperación cuando se realizaba la siembra directa del escobillón sobre placa en relación a la siembra de homogenización en masa. Sin embargo el tiempo de agitación aplicado sólo fue de 10 segundos.

Además de las causas que intervienen directamente sobre la sensibilidad de la técnica de escobillonado, las bacterias presentes en superficies secas podrían estar sometidas a un cierto estrés, lo que sugiere que los métodos de recuento en placa podrían no detectar todas las bacterias viables (Davidson y cols., 1999). Por el cual, diferentes autores recomiendan la técnica DEM para determinar la viabilidad de las bacterias adheridas en superficies (Takeuchi y Frank, 2001; Salo y cols., 2002). Por ello, esta ha sido utilizada en nuestro estudio para realizar la comparación con el método tradicional de escobillonado.

2.2. Aplicación de la microscopia de epifluorescencia directa (DEM)

En la **Tabla 10** se presentan los recuentos obtenidos en placa y en DEM tras el secado de los discos a 37°C durante 45 minutos. El recuento de bacterias obtenido en el hisopado en relación al recuento inicial fue inferior en aproximadamente 1 log ufc/cm² en los inóculos comprendidos entre 2 y 6 log ufc/cm², lo que sugiere, una pérdida de viabilidad de las bacterias por efecto del secado, y que coincide, con las observaciones de otros autores en estudios de superficies realizados mediante hisopado para la recuperación de *Listeria spp* cuando se le aplicaba un secado rápido (Cox y cols., 1989; Davidson y cols., 1999). Sin embargo, el recuento de *L. monocytogenes* obtenido mediante DEM no fue significativamente inferior ($P \geq 0,05$) al inóculo inicial, excepto en el disco inoculado aproximadamente con 7,38 log ufc/cm². Esta diferencia se debe a que cuando se realiza la observación en un microscopio de epifluorescencia el plano obtenido es bidimensional y en recuentos elevados las bacterias suelen encontrarse en diferentes planos por lo que sería más preciso la aplicación de otras técnicas como la microscopia láser confocal (Takeuchi y Frank, 2001). Sin embargo, a estos recuentos elevados se observó mayor cantidad de bacterias lesionadas (coloración naranja-rojiza) que vivas (color verde), especialmente en el plano superior más expuesto a las condiciones adversas del secado. Ello confirma que el recuento en placa no detectó todas las bacterias viables, mientras que la observación directa de los discos con el microscopio nos permitió cuantificar el recuento real de bacterias viables, lesionadas y muertas.

El secado de las superficies puede producir un estrés subletal sobre las bacterias (Rose y cols., 2003). Otra causa de estrés bacteriano que podría disminuir la viabilidad de las bacterias, descrita por (Moore y Griffith, 2002a), se produce como consecuencia del proceso de escobillonado *per se*. Así, los métodos de recuento en placa, no pueden detectar todas las

bacterias viables, especialmente las bacterias sometidas a un estrés ambiental (Moore y Griffith, 2002b). Según Yu y McFeters (1994), algunas bacterias sometidas al estrés, como por ejemplo la desecación, pueden perder la capacidad de crecer en un medio sólido a pesar de ser viables y entrar en un estado denominado células viables pero no cultivables (VBNC). El estado VBNC, es aquel en el cual las células estresadas muestran una actividad respiratoria y metabólica normal, pero no se pueden recuperar en un medio de cultivo general incluso los microorganismos patógenos conservan su virulencia (Servis y cols., 1995). Otros autores observaron mediante DEM, células VBNC de *L. monocytogenes* a pesar de que permanecían viables en el agua después de 10 semanas de inanición (Besnard y cols., 2000). Por lo tanto, sería recomendable el uso de tinciones fluorescentes junto con microscopio de epifluorescencia para poder ser capaces de matizar el estado de viabilidad en el cual se encuentran las bacterias (Breeuwer y Abee, 2000; Maukonen y cols., 2000).

Tabla 10. Comparación entre la técnica DEM y el escobillonado y recuento placa en la recuperación de *L. monocytogenes* de inoculada en discos de acero inoxidable (media \pm desviación estándar)

Inóculo inicial	DEM-Análisis imagen	Hisopo-placa
Log (ufc/cm ²)	Log (ufc/cm ²)	Log (ufc/cm ²)
7,29 ^a \pm 0,22	5,94 ^b \pm 0,92	6,64 ^a \pm 0,48
6,29 ^a \pm 0,22	5,36 ^a \pm 0,62	4,98 ^b \pm 0,57
5,29 ^a \pm 0,22	4,64 ^a \pm 0,41	3,85 ^b \pm 0,61
4,29 ^a \pm 0,22	4,20 ^a \pm 0,83	2,95 ^b \pm 0,51
3,29 ^a \pm 0,22	3,17 ^a \pm 1,08	1,84 ^b \pm 0,48
2,29 ^a \pm 0,22	<LD	1,11 ^b \pm 0,36
1,29 ^a \pm 0,22	<LD	0,92 ^b \pm 0,44

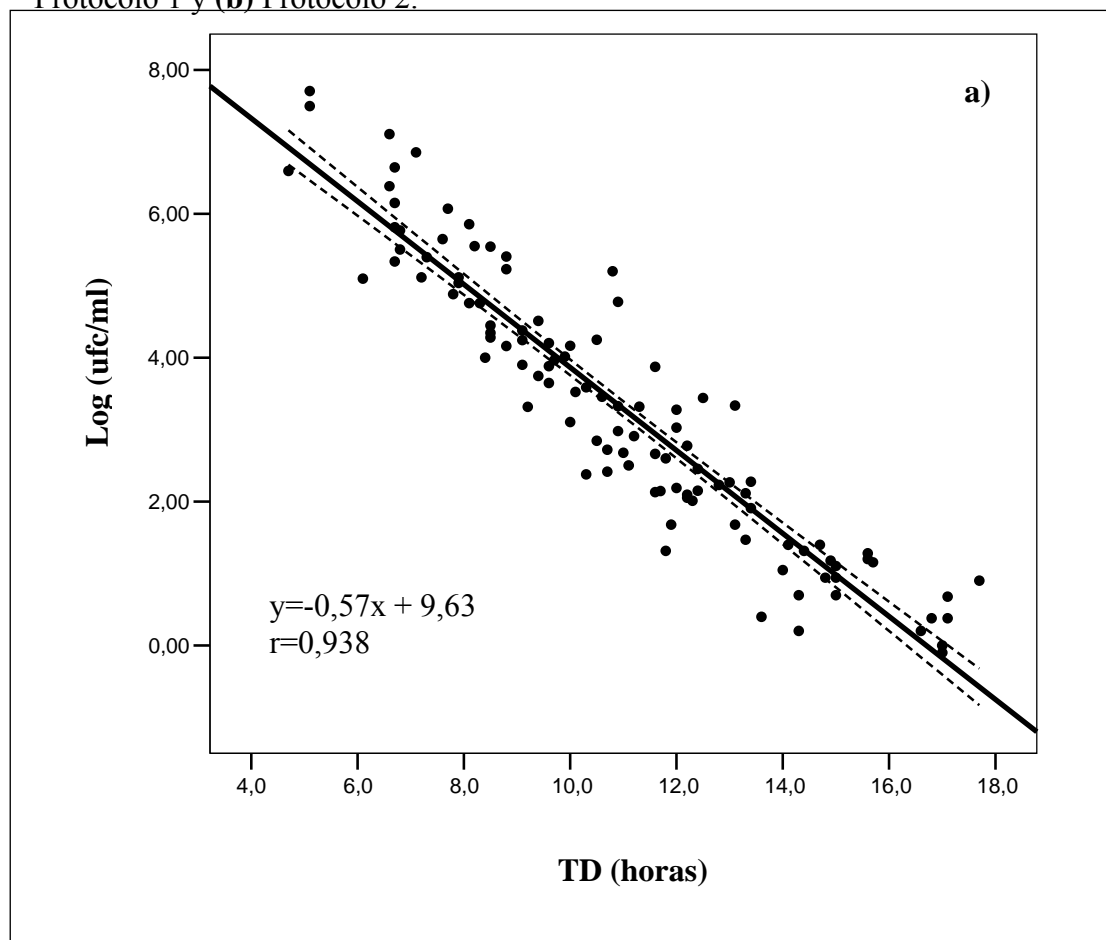
^{a, b} Valores medios de la misma fila con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

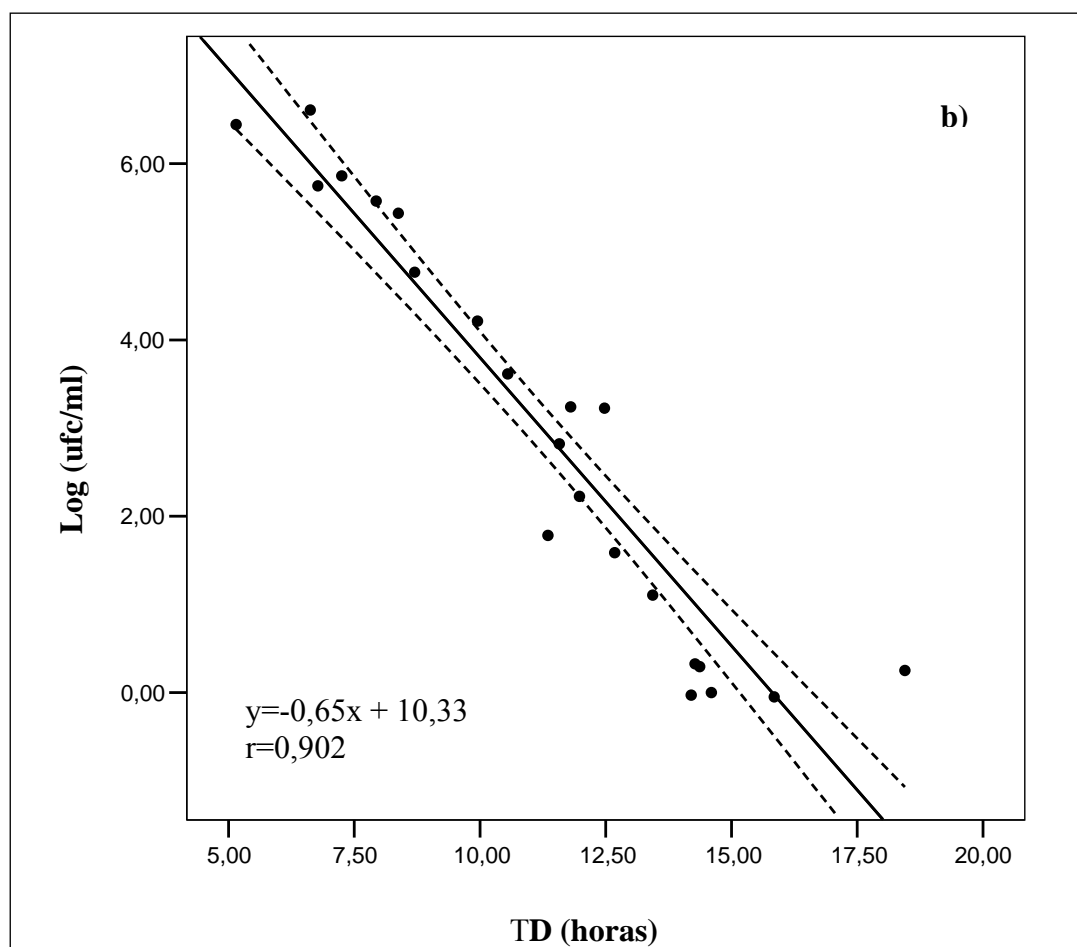
LD: Límite de detección

2.3. Aplicación de la impedancia en la detección de microorganismos en superficies

En la **Figura 19** se muestran los resultados obtenidos al realizar la calibración del recuento de *L. monocytogenes* respecto al tiempo de detección (TD, horas) obtenido por impedancia con el equipo Bactometer™. La relación entre ambas variables es de tipo lineal presentando una correlación (r) de 0,938 y altamente significativa ($P < 0,01$), cuando se comparó el recuento en placa y el TD correspondiente al protocolo 1 que consistió en un hisopado de las superficies, seguido de la homogenización del hisopo en el tubo de dilución, y finalmente la inoculación en los módulos del Bactometer™ (**Figura 19a**). En el caso del protocolo 2, correspondiente al hisopado de la superficie seguido de la introducción del hisopo directamente dentro de los módulos, se obtuvo una correlación altamente significativa de 0,902 (**Figura 19b**).

Figura 19. Recta de regresión del recuento de *L. monocytogenes* en placa log (ufc/ml) respecto al tiempo de detección (TD) obtenido por impedancia. (a) Protocolo 1 y (b) Protocolo 2.





En la **Tabla 11** se muestra el recuento en placa y los tiempos de detección obtenidos mediante impedancia, tras recuperar *L. monocytogenes* de los discos inoculados con diferentes niveles de contaminación y posteriormente secados durante 45 minutos a 37°C. El TD obtenido en los discos inoculados con 7,37 log (ufc/ml) fue de aproximadamente 7 h y conforme disminuía el nivel de inoculación aumentaba el tiempo de detección. Se produjo el efecto esperado, ya que el TD se denomina al tiempo necesario para que las bacterias se multipliquen y lleguen a un umbral determinado que se manifiesta con un cambio eléctrico en el medio detectado por el equipo. A menor concentración de bacterias se necesita más tiempo para llegar al umbral (Holah y Thorpe, 1990; Gibson y cols., 1995).

No se observaron diferencias significativas entre las medias del TD obtenido entre ambos protocolos cuando el recuento inicial era igual o superior a 5,37 log (ufc/ml). Sin embargo, a partir del inóculo 4,37 log (ufc/ml) las medias de los TD obtenidos con el protocolo 1 fueron significativamente superiores a las obtenidas con el protocolo 2 (**Tabla 11**). Esto puede ser

debido a que en el protocolo 2 el hisopo se introdujo directamente en los módulos, sin embargo en el protocolo 1 se realizó una dilución previa a la inoculación de los mismos.

Por otro lado, los resultados de impedancia se compararon con el TD obtenido para *Listeria* spp. en un trabajo previo de calibración de la técnica de impedancia con el recuento en placa ($y=-0,566x+8,339$; $r=0,9894$; $P<0,01$). Los TD obtenidos en *L. monocytogenes* de las muestras en superficie, fueron significativamente superiores a los calculados en la recta de calibración de *Listeria* spp. Este retraso de entre dos y tres horas en el TD, independientemente del inóculo inicial, podría atribuirse a lesiones subletales desencadenadas por el secado y/o escobillado de las superficies, manifestándose con un crecimiento lento y/o una pérdida de viabilidad celular. Estos resultados coincidirían con los observados cuando se realizó la comparación de escobillado y recuento en placa respecto a la técnica DEM. Silley y Forsythe (1996) observaron que en la recuperación de un biofilm de *Streptococcus bovis* adherido a una superficie de acero inoxidable mediante el sistema de impedancia Malthus, se detectaron bacterias viables y VBNC, mientras que en los métodos de recuento en placa sólo crecieron las células viables.

Tabla 11. Comparación entre TD de *L. monocytogenes* recuperada sobre una superficie respecto al TD obtenido en la calibración de *Listeria* spp (media \pm desviación estándar).

Recuento placa	Impedancia-Bactometer TM		
	Hisopo log (ufc/ml)	Protocolo 1 TD (horas)	Protocolo 2 TD (horas)
5,68 \pm 0,22	7,41 ^a \pm 0,58	7,47 ^a \pm 0,82	4,69 ^b \pm 0,25
4,49 \pm 0,40	9,19 ^a \pm 0,67	9,33 ^a \pm 0,88	6,80 ^b \pm 0,28
3,36 \pm 0,22	10,98 ^a \pm 0,87	11,61 ^a \pm 0,98	8,80 ^b \pm 0,28
2,28 \pm 0,52	12,50 ^a \pm 0,94	11,64 ^b \pm 0,32	10,71 ^c \pm 0,38
1,35 \pm 0,42	14,49 ^a \pm 1,55	13,06 ^b \pm 0,53	12,35 ^c \pm 0,36
0,19 \pm 0,21	16,53 ^a \pm 1,30	14,83 ^b \pm 0,88	14,40 ^b \pm 0,46

^{a-c} Valores medios de la misma fila con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P<0,05$).

El tiempo máximo de detección fue de aproximadamente 15-17 h para detectar 0,19 log ufc/ml (1,54 ufc/ml), respecto a las 48h necesarias con el recuento en placa. La enumeración rápida de bacterias mediante la impedancia se ha observado en muchas matrices de alimentos. Russell (2000), comparó diferentes métodos clásicos de recuento en placa (NMP, Petrifilm, SimPlates) respecto el método de impedancia con Bactometer™ para el recuento de *E. coli* en canales de pollo y carne picada y observaron que los resultados obtenidos con el Bactometer™ fueron entre 1-11 h, mientras que los métodos clásicos de recuento en placa necesitaron como mínimo 48 h.

2.4. Aplicación de la bioluminiscencia para la detección de microorganismos en superficies

La molécula de ATP abunda en la mayoría de seres vivos incluyendo las secreciones del cuerpo, alimentos etc. Por lo tanto, la técnica de ATP medida por bioluminiscencia detecta la contaminación procedente de células y residuos de materia orgánica (Griffith y cols., 1997).

El resultado obtenido de la calibración del método tradicional de recuento de *L. monocytogenes* en placa respecto al valor de ATP obtenido por bioluminiscencia fue altamente significativo ($P < 0,01$), con un coeficiente de correlación de 0,964 correspondiente a la recta $y = 0,64x + 1,08$. El alto nivel de concordancia obtenido indicó que, la técnica de bioluminiscencia basada en la detección de ATP aplicada en condiciones experimentales, fue un método válido, rápido y preciso para la detección de microorganismos en superficies, y por lo tanto que permite controlar la higiene de superficies. Además, trabajar con una cepa pura, en este caso, *L. monocytogenes* permitió asegurar que el nivel de ATP extracelular (derivados restos de materia orgánica o del caldo de cultivo) no interferiría en el resultado como ya demostraron Davison y cols. (1999). Cabe mencionar que cuando los recuentos fueron superiores a 4,98 log ufc/cm² aproximadamente, no se observaron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) en el valor de ATP obtenido. Ello puede ser debido a que este valor se correspondería con el límite máximo de detección de la técnica de bioluminiscencia. Según la casa comercial, por encima de 150000 RLU el aparato (UNI-LITE®, Biotrace Ltd) no proporciona el valor, sino que anuncia que se ha superado el límite máximo.

Por otra parte, el límite mínimo de detección de ATP fue de 2,28 log RLU/cm² o 190 RLU/cm² equivalente a la detección mediante hisopo y recuento en placa de 1,84 log ufc/cm²

o 70 ufc/cm². Este valor indica que la técnica de bioluminiscencia es capaz detectar la presencia de recuentos relativamente bajos de bacterias presentes en superficies y que coincide relativamente con el límite de detección entorno a 10² ufc/cm² obtenido por otros autores (Davidson y cols., 1999; Corbitt y cols., 2000). Aunque no coincide con el límite de 10⁴ ufc/cm² sugerido por otros autores en superficies secas (Moore y cols., 2001), a pesar de que utilizó el mismo tipo de hisopo para la medición de ATP (Biotrace Clean Trace™ Rapad Cleanliness Test).

Tabla 12. Recuperación de *L. monocytogenes* inoculada en acero inoxidable utilizando el método de detección de ATP por bioluminiscencia (media ± desviación estándar).

Hisopo-placa		ATP-Bioluminiscencia	
Log (ufc/cm ²)	Log (RLU/cm ²)	Log calculado (ufc/cm ²)	
6,64 ^a ± 0,48	4,75 ^A ± 0,43	4,60 ^b ± 0,35	
4,98 ^a ± 0,57	4,60 ^A ± 0,35	3,95 ^a ± 0,20	
3,85 ^a ± 0,61	3,95 ^B ± 0,20	3,01 ^a ± 0,24	
2,95 ^a ± 0,51	3,01 ^C ± 0,24	2,28 ^a ± 0,32	
1,84 ^a ± 0,48	2,28 ^D ± 0,32	1,70 ^a ± 0,16	

^{a,b} Valores medios de la misma fila con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

^{A-D} Valores medios de la misma columna con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

En general, las bacterias no suelen colonizar la superficies sin la presencia de residuos orgánicos ni en estado de cultivo puro; consecuentemente los resultados mostrados en la **Tabla 12** muestran una situación ideal que, por otro lado, en muchas ocasiones no se parece a la realidad. Algunos estudios muestran considerables variaciones entre lecturas de ATP y recuentos en unidades formadoras de colonias (Griffith y cols., 2000), mientras que otros muestran una variabilidad menor. Por ejemplo, se ha comprobado que los detergentes y desinfectantes reducen la sensibilidad de la técnica de la bioluminiscencia del ATP, ya que disminuyen la señal de luz debido a la interacción de estas sustancias con los reactivos del kit (Velazquez y Feirtag, 1997).

Venkateswaran y cols. (2003) observaron que la determinación de ATP pudiera ser un sistema de evaluación de las células VBNC. En nuestro caso al realizar la correlación con los recuento por DEM, ésta fue inferior a la obtenida mediante hisopado ($y=0,856X +1,959$; $r=0,884$; $P<0,01$).

2.5. Detección y recuperación de células lesionadas de *L. monocytogenes*

Se realizó un segundo estudio para determinar la presencia de células dañadas debido al estrés ambiental del secado de los discos o derivado del proceso de escobillado. Un daño subletal generalmente produce una marcada sensibilidad de las bacterias que han conseguido sobrevivir a un tratamiento o a unas condiciones adversas. No obstante en condiciones óptimas las células dañadas son capaces de repararse a diferencia de las VBNC (Foong y Dickson, 2004).

La posible presencia de células lesionadas de *L. monocytogenes*, tras el hisopado de las superficies secas, se determinó mediante la siembra de las bacterias en un medio nutritivo suplementado con 3% NaCl (Patterson y cols., 1995). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P\geq 0,05$) en las reducciones decimales observadas entre el medio nutritivo y el medio suplementado con sal, ni en el método de recuento en placa ni en la evaluación mediante impedancia (**Tabla 13**). Estos resultados aparentemente indicarían que el proceso de secado y/o escobillado no originarían bacterias lesionadas, sin embargo, posteriores estudios sugieren que la concentración de sal necesaria para determinar bacterias de *L. monocytogenes* lesionadas es de un 4% (Mathew y Ryser, 2002) o un 5% (Garcia y cols., 2005).

Tabla 13. Efecto de la sal suplementada en los medios BHIAYE y GPM sobre el crecimiento *L. monocytogenes* (media \pm desviación estándar)

Hisopo-recuento en placa		Hisopo-Impedancia			
BHIAYE ^a	BHIAYE+3%NaCl ^a	GMP ^A		GMP+3% NaCl ^A	
Log (ufc/disco)	Log (ufc/disco)	TD		TD	
7,37 ^a \pm 0,67	7,25 ^a \pm 0,60	ND	ND	ND	ND
6,67 ^a \pm 0,34	6,70 ^a \pm 0,38	6,45 ^A \pm 0,87		6,45 ^A \pm 0,85	
4,98 ^a \pm 0,35	5,01 ^a \pm 0,30	7,88 ^A \pm 1,91		8,85 ^A \pm 1,89	
3,46 ^a \pm 0,77	3,08 ^a \pm 1,25	8,78 ^A \pm 2,26		8,63 ^A \pm 2,45	
2,63 ^a \pm 0,64	2,61 ^a \pm 0,71	9,58 ^A \pm 2,84		9,20 ^A \pm 2,77	
1,50 ^a \pm 0,98	1,56 ^a \pm 1,14	12,04 ^A \pm 5,17		10,64 ^A \pm 3,97	
1,10 ^a \pm 0,47	0,76 ^a \pm 0,64	12,82 ^A \pm 5,65		12,42 ^A \pm 4,53	
1,05 ^a \pm 0,59	0,53 ^a \pm 0,43	ND	ND	ND	ND

^a Valores medios de la misma fila con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

^A Valores medios de la misma fila con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

BHIAYE: Brain Heart Infusión agar with yeast extract

ND: no determinado

3. Verificación de la limpieza y desinfección de una industria alimentaria mediante diferentes métodos de control

En este estudio se determinó el nivel de contaminación de una industria alimentaria de productos congelados y se identificó la flora bacteriana residente con el fin de verificar el programa de limpieza y desinfección implantado en la industria. Para ello se aplicaron los diferentes métodos de control de superficies ya empleados en el estudio previo realizado en condiciones de laboratorio.

3.1. Aplicación de la microscopía de epifluorescencia directa

Con el objetivo de evaluar las condiciones higiénicas de las superficies de la planta, así como el posible desarrollo de biofilms se colocaron discos de acero inoxidable en las diferentes superficies de la planta y permanecieron en las mismas durante una semana. De forma que los discos fueron un reflejo real de las superficies normales de trabajo, ya que estaban sometidas a la misma contaminación derivada de los procesos de manipulación, así como al mismo protocolo de limpieza y desinfección.

Transcurrido el tiempo, los discos se analizaban tras el último proceso de higienización. La **Tabla 14** y **15** muestra los recuentos de bacterias teñidas de color verde (vivas) y de color rojo (lesionadas y/o muertas) por cm^2 obtenidos a partir de la observación de los discos en el microscopio de epifluorescencia y analizados mediante el programa *analySIS*[®]. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias del recuento de células verdes de las tres zonas (**Tabla 15**). Así, la zona de carne mostró un recuento significativamente inferior a la zona de elaborados y cocina. En esa zona los recuentos estaban o bien por debajo del límite de detección o entorno al mismo. Además, aunque no se observaron diferencias entre cocina y elaborados, se detectaron más discos con un recuento bacteriano por debajo del límite de detección en la cocina (**Tabla 14**). En cuanto al recuento de células rojas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias del recuento de las tres zonas (**Tabla 15**).

Tabla 14 Recuentos de bacterias vivas y lesionadas/muertas adheridas a los discos tras la higienización, distribuidos en 24 puntos de la planta analizados mediante microscopia (media \pm desviación estándar).

Zona	ID	Superficies	Log (bact./cm ²) mediante DEM	
			Verdes	Rojas
Carne	1	cinta salida túnel congelación	<LD	4,11 -
	3	mesa de despiece grande	<LD	3,03 \pm 0,51
	4	mesa de despiece pequeña	2,94 \pm 0,46	3,67 \pm 0,93
	5	mesa despiece con cajones	3,02 -	3,94 \pm 0,28
	6	sierra sala despiece	2,54 -	3,80 \pm 0,18
	Subtotal			2,83 \pm 0,26
Elaboración y envasado	7	bañeras cefalópodos	3,55 \pm 0,98	4,17 \pm 0,77
	8	cinta llegada gaseadora	3,49 \pm 0,11	4,47 \pm 0,75
	9	cinta a túnel de secado	<LD	3,79 \pm 0,66
	12	cinta salida túnel secado	3,20 -	<LD
	13	cinta a glaseadora grande	3,62 -	4,34 -
	14	cinta a glaseadora pequeña	4,42 \pm 0,55	3,86 \pm 0,74
	17	maquina lavado cefalópodos	3,61 \pm 0,07	3,60 \pm 1,06
	18	mesa manipulación 1	3,54 \pm 0,06	4,26 \pm 0,85
	19	mesa manipulación 2	3,57 -	3,39 \pm 0,61
	20	mesa manipulación 3	3,24 -	3,40 \pm 0,86
Subtotal			3,58 \pm 0,35	3,99 \pm 0,60
Cocina	22	mesa microondas	3,88 \pm 0,34	4,75 \pm 0,57
	23	mesa preparación de ingredientes	3,44 -	2,93 \pm 0,67
	24	mesa emplatado 1	<LD	4,27 \pm 0,70
	25	mesa emplatado 2	<LD	4,15 \pm 0,26
	26	mesa emplatado 3	3,39 -	3,85 \pm 0,28
	27	vasculante 1	3,39 -	4,50 -
	28	vasculante 2	3,35 \pm 0,28	3,53 \pm 0,34
	29	pica zona preparación 1	<LD	5,65 -
	30	pica zona preparación 2	3,35 -	4,96 -
	31	lavabo	3,70 \pm 0,06	3,14 \pm 0,56
Subtotal			3,35 \pm 0,45	4,18 \pm 0,89
Total			3,38 \pm 0,45	4,00 \pm 0,69

LD: límite de detección

Tabla 15 Recuento medio por zona de bacterias vivas y lesionadas/muertas adheridas al disco tras la higienización analizado mediante microscopia (media \pm desviación estándar).

Zona	Recuento bacterias mediante DEM	
	Log (verdes/cm ²)	Log (rojas/cm ²)
Carne	2,83 ^a \pm 0,26	3,71 ^a \pm 0,41
Elaboración y envasado	3,58 ^b \pm 0,35	3,99 ^a \pm 0,60
Cocina	3,35 ^b \pm 0,45	4,00 ^a \pm 0,69

^{a-c} Valores medios de la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

En las **Figuras 20, 21 y 22** se muestran las imágenes de las diferentes zonas en las que se refleja el grado de suciedad y contaminación microbiana. Cada una de las imágenes representa un campo microscópico aleatorio de la superficie del disco, siendo 0,003 cm² la superficie total analizada. Este dato fue importante porque en un área tan pequeña se observó una gran heterogeneidad en el grado de higiene. Así, en un mismo disco se observaron campos microscópicos limpios, es decir ausencia de suciedad y microorganismos, campos con presencia de suciedad y campos con bacterias y suciedad.

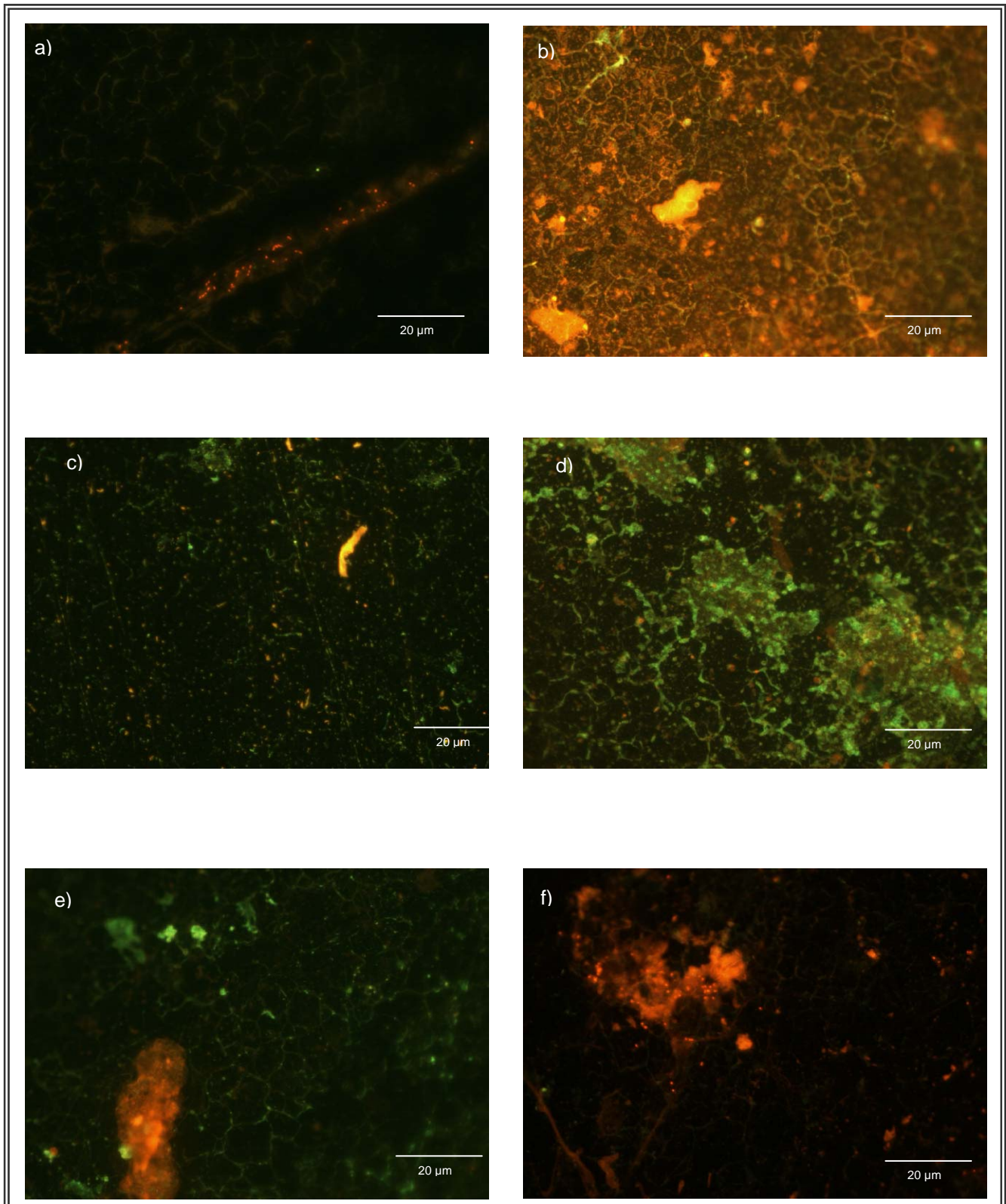
En la zona de carne, el grado de suciedad era intermedio, aunque destacaban algunas imágenes especialmente sucias (**Figuras 20b, 20d, 20i, y 20l**), sucias con bacterias agregadas (**Figura 20d**), limpias con bacterias lesionadas y/o muertas (**Figuras 20f y 20j**), bacterias vivas (**Figura 20e**) y superficies completamente rayadas con presencia de bacterias en su interior (**Figura 20i**).

Mientras que, en la zona de elaborados, se observó un grado de suciedad alto en la mayoría de campos (**Figuras 21a, 21b, 21f y 21l**) y agregados de bacterias vivas que en pocas horas probablemente formarían un biofilm, así como bacterias embebidas en restos de materia orgánica (**Figura 21j**), también se observaron algunas imágenes con agregados de bacterias lesionadas y/o muertas (**Figuras 21a, 21c, 21d y 21g**), y otras con bacterias vivas y lesionadas (**Figura 21i**).

Y en la cocina, se apreció un grado de suciedad intermedio (**Figuras 22a, 22b, 22d y 22e**), también se observó la presencia de suciedad con agregados de bacterias, sobretodo teñidas de

color rojo (**Figuras 22b, 22c y 22j**), así como microorganismos con un tamaño superior al de una bacteria correspondiente probablemente a levaduras (**Figuras 22h y 22i**).

Figura 20 (a-l). Imágenes de epifluorescencia de bacterias y suciedad adherida a discos de acero inoxidable distribuidos por la zona de carne.



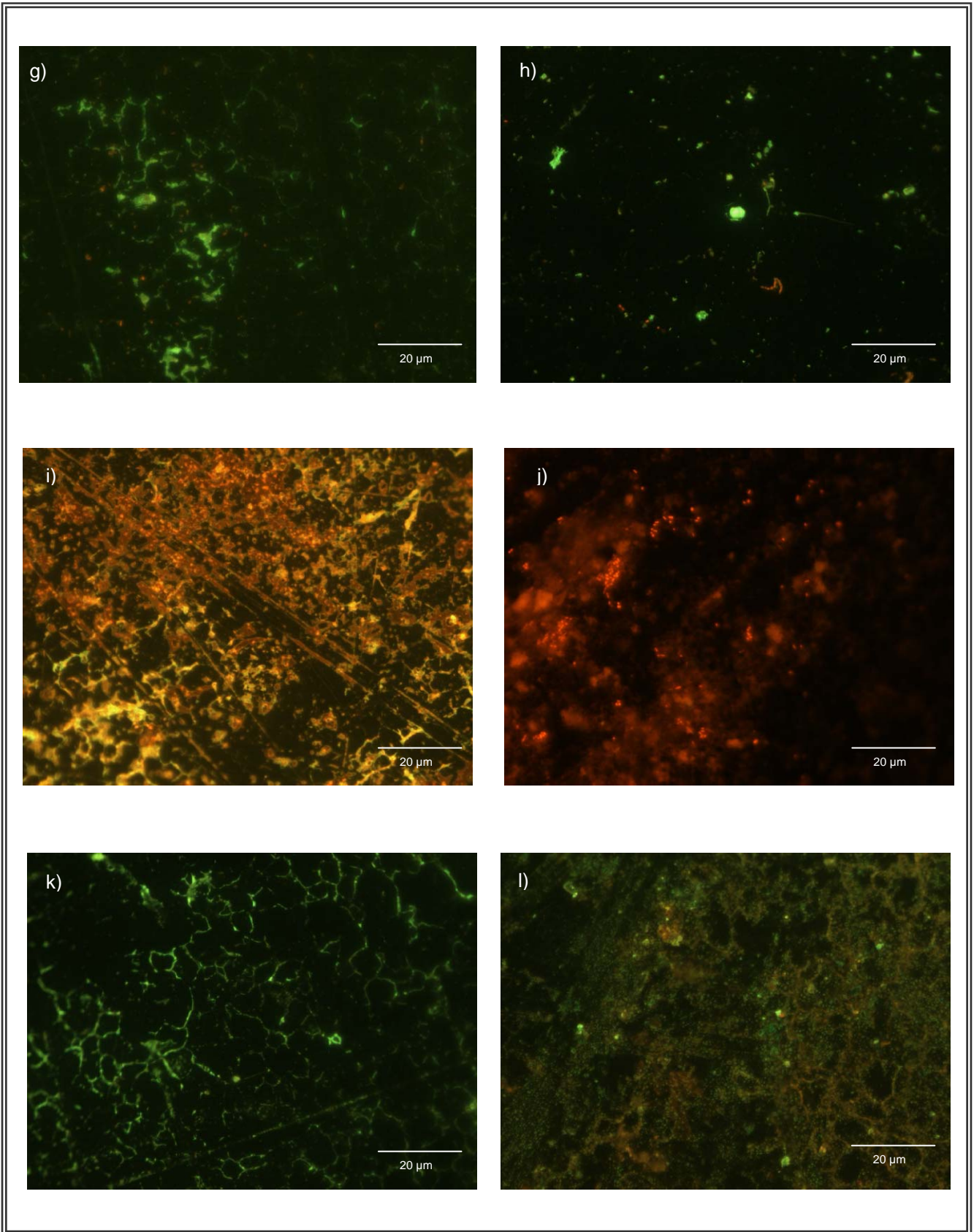
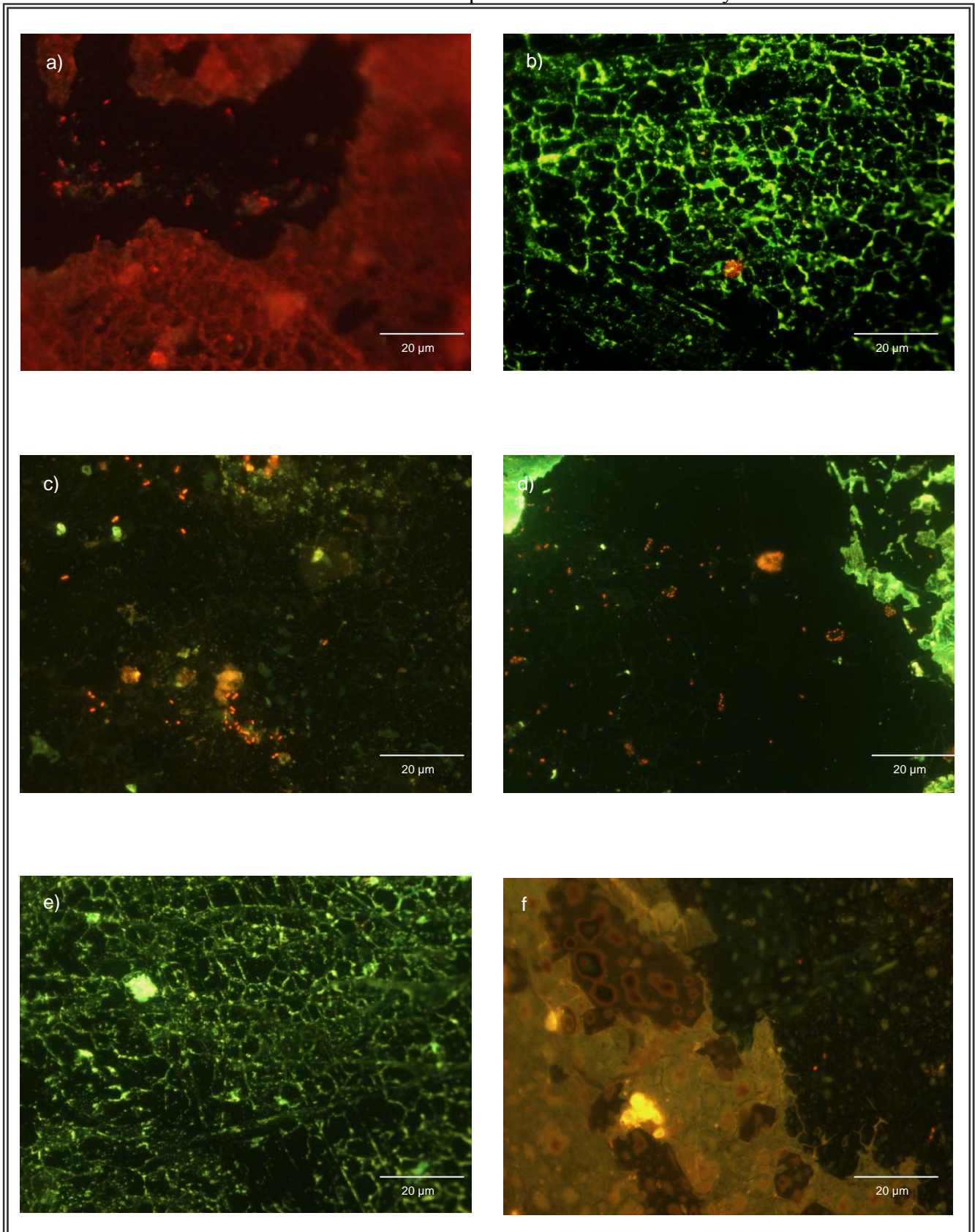


Figura 21 (a-l). Imágenes de epifluorescencia de bacterias y suciedad adherida a discos de acero inoxidable distribuidos por la zona de elaboración y envasado.



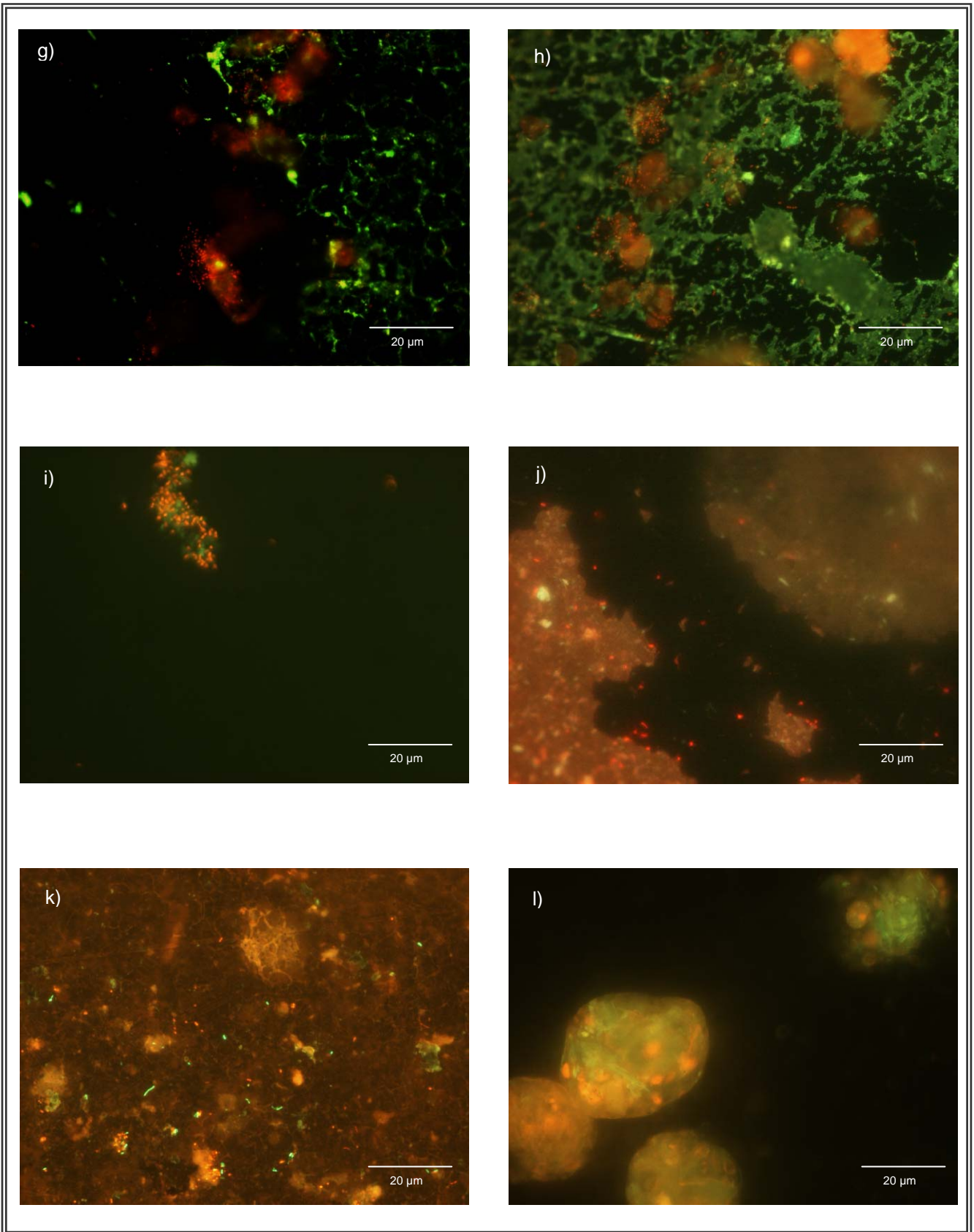
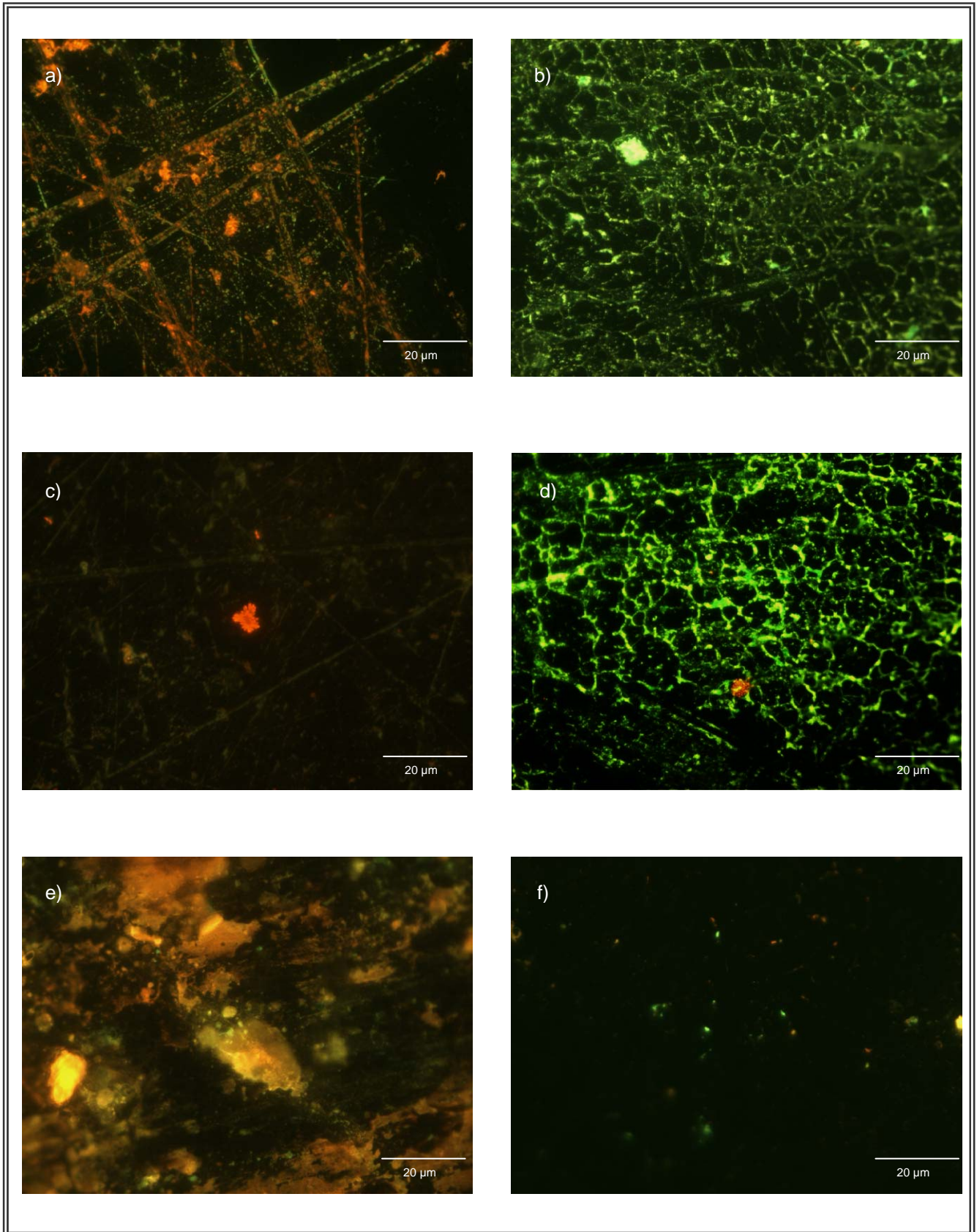
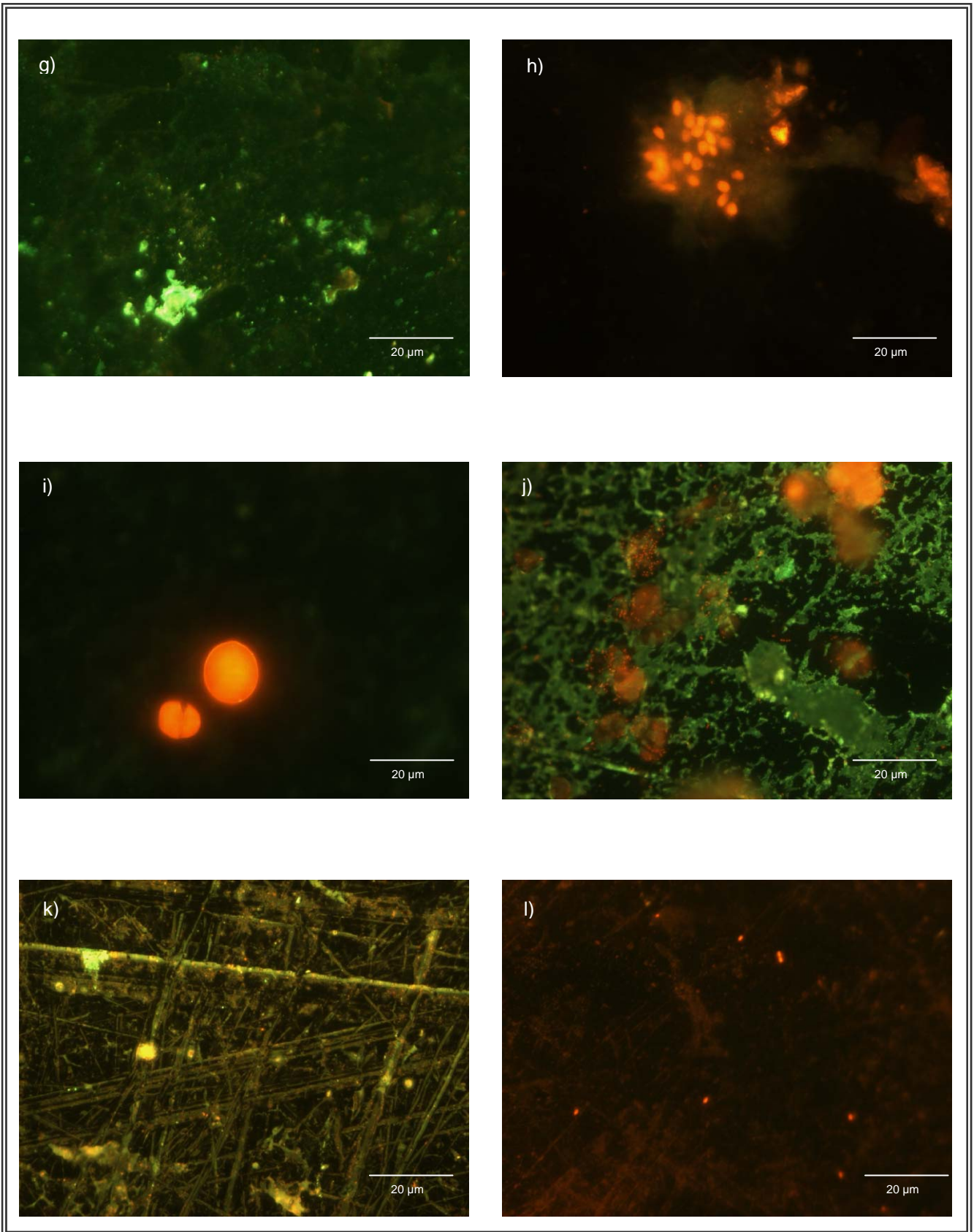


Figura 22 (a-l). Imágenes de epifluorescencia de bacterias y suciedad adherida a discos de acero inoxidable distribuidos por la zona de la cocina.





Las imágenes son un reflejo del estado real del nivel de contaminación y suciedad de las superficies en las que se evidencia que los restos de materia orgánica no fueron eliminados de forma adecuada con la limpieza. Además, los recuentos elevados de células viables y no viables sugirieron que la desinfección no fue efectiva. La ineficacia del desinfectante se podía explicar por varias razones; entre ellas, la posibilidad de que el desinfectante tuviera una acción bacteriostática más que bactericida, debido a que la concentración aplicada en la superficie no fue la apropiada (Grönholm y cols., 1999), hecho reflejado por la elevada presencia de células no viables que sufrieron como mínimo una alteración en la membrana plasmática (Maukonen y cols., 2000). Algunos estudios de eficacia desinfectante en superficie han demostrado que es necesario utilizar una concentración 10 veces superior del desinfectante, para conseguir la misma efectividad que cuando se realiza el estudio en suspensión (van Klingeren, 1995). Además, estudios recientes han demostrado que tras un estrés causado por un factor externo, como puede ser un choque osmótico, térmico o la desinfección, se puede observar una pérdida de la viabilidad celular (Caro y cols., 1999). Por lo que las técnicas de microbiología tradicional de escobillado pueden llegar a infraestimar el recuento (Moore y Griffith, 2002b).

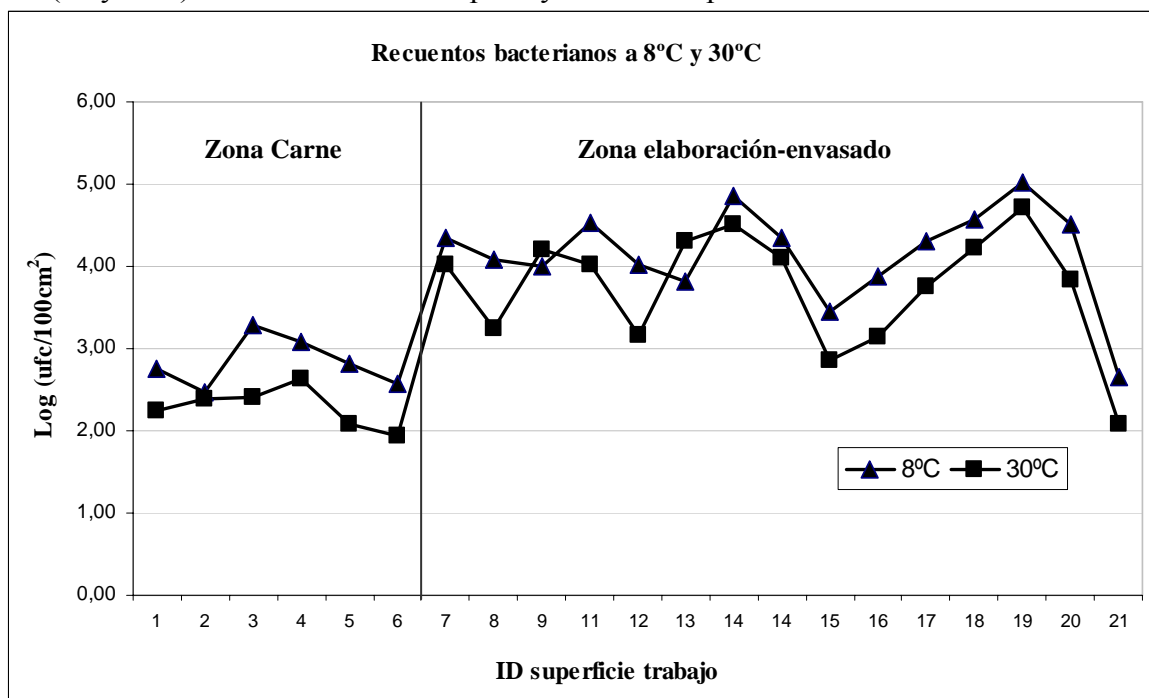
La eficacia de recuperación se reduce aún más, debido a que la técnica *per se* induce a un estrés en la viabilidad del microorganismo. Por lo que es preferible hacer una verificación con métodos directos como la microscopía de epifluorescencia, que permite diferenciar con más precisión si los desinfectantes aplicados poseen actividad bactericida o bacteriostática (Bredholt y cols., 1999; Wirtanen y cols., 2001b). Además, cuando una superficie está colonizada por bacterias adheridas y forman un biofilm la concentración de desinfectante necesaria para eliminarlo es de 10 a 100 veces superior a la necesaria en condiciones normales (Mah y O'toole, 2001). Finalmente, la presencia de materia orgánica, también puede ser una causa de inactivación del desinfectante aplicado (Mosteller y Bishop, 1993; Grönholm y cols., 1999). Además la aplicación de un desinfectante con una concentración insuficiente puede provocar la aparición de bacterias resistentes, hecho que hace recomendable la rotación de desinfectantes con diferentes mecanismos de acción para prevenir estas resistencias (Langsrud y cols., 2003).

3.2. Aplicación de la técnica de escobillonado y determinación del ATP

El conjunto de observaciones realizadas mediante microscopia de epifluorescencia fueron determinantes para decidir que no se podía tomar la muestra de un solo punto de la superficie de trabajo debido a que la contaminación era muy heterogénea, sino que se debía muestrear más de uno. Así, teniendo en cuenta la apreciación real del nivel de contaminación de las superficies a través de la técnica DEM, se estableció realizar cuatro puntos de muestreo de una misma superficie de trabajo.

Otro aspecto a considerar es el tipo de microbiota que puede desarrollarse en zonas con una temperatura ambiental de 12°C concretamente en la zona de carne y la de elaboración-ensado. Por ello, se realizó el recuento de microorganismos incubados a 8°C (psicrófilos) y 30°C (mesófilos). En los resultados obtenidos no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0,05$) entre ambos recuentos en cualquiera de las superficies de trabajo (**Figura 23**). También se realizó la comparación entre estos recuentos obtenidos del agua de las glaseadoras cuya temperatura oscilaba entre 0-2°C y tampoco mostraron diferencias entre las dos temperaturas de incubación. Estos resultados sugirieron que la microbiota residente en la planta era psicotrofa y por lo tanto la temperatura de incubación elegida durante todo el estudio fue de 30°C.

Figura 23. Recuentos de microorganismos aerobios incubados a dos temperaturas (30 y 8°C) obtenidos tras el hisopado y análisis en placa.



3.2.1. Establecimiento de límites microbiológicos y de ATP

La asociación entre un valor de ATP y el recuento microbiano pudiera ser una herramienta muy útil, la cual nos podría aportar información a la hora de establecer unos límites microbianos de aceptación y/o rechazo en la monitorización de la higiene de superficies. Sin embargo, la correlación obtenida entre ambos parámetros fue muy reducida, tanto considerando todos los valores ($r=0,309$; $P<0,05$), como limitando el análisis solo aquellos puntos con recuentos superiores a $3,85 \log \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$, correspondiente al límite de detección de la técnica de ATP ($r=0,390$; $P<0,05$), como ya se mencionó anteriormente. La dificultad que supone relacionar la técnica de bioluminiscencia con el recuento en placa se debe en gran parte a que la técnica de bioluminiscencia mide la cantidad total de ATP, indicativa tanto de presencia de microorganismos como de residuos orgánicos (Griffiths, 1997). Además, Venkateswaran y cols. (2003) señalaron que la cantidad de ATP que contiene una célula depende del tamaño y de su estado vital. Es importante destacar que un microorganismo viable contiene 10^{-17} mol ATP a diferencia de una endospora que contiene 10^{-21} mol ATP. También, algunos autores señalan que los detergentes y desinfectantes pueden reducir la actividad de la enzima luciferasa (Miettinen y cols., 2001).

Esta baja correlación obtenida, sugirió que se debía establecer límites microbiológicos y valores de ATP de forma independiente. Así, en el caso del recuento bacteriano se estableció como límite satisfactorio, la media del recuento bacteriano correspondiente a aproximadamente a $300 \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$ ($2,48 \log \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$) y como límite insatisfactorio el valor superior del intervalo de confianza al 95% correspondiente a aproximadamente a $500 \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$ ($2,70 \log \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$). El límite satisfactorio difería ligeramente del límite crítico aplicado por la industria evaluada que era de $250 \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$, que fue establecido utilizando el método de impronta. En el caso de los valores de ATP, el límite satisfactorio fue igualmente la media del valor de ATP correspondiente a $850 \text{ RLU}/100 \text{ cm}^2$ ($2,93 \log \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$) y como límite insatisfactorio el doble de este valor correspondiente a $1700 \text{ RLU}/100 \text{ cm}^2$ ($3,23 \log \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$). Este valor fue elegido teniendo en cuenta las indicaciones de las empresas que comercializan equipos de bioluminiscencia (Biotrace, Reino Unido). El intervalo entre el valor de satisfactorio e insatisfactorio se le denominó aceptable.

Aunque la técnica de hisopado ha demostrado una escasa eficacia en la detección del número de microorganismos adheridos a las superficies, o cuando éstos se encuentran en bajo número,

esta técnica se sigue aplicando en el sector alimentario debido a que su uso es simple y se adapta a la geometría de las distintas superficies (Foschino y cols., 2003). Además, es uno de los métodos establecidos para el muestreo de superficies de mataderos recogido en la Decisión 2001/471/CE (Anónimo, 2001). Actualmente, no existen normas microbiológicas de obligado cumplimiento para el control microbiano en superficies a excepción de esta. Únicamente se pueden encontrar algunas recomendaciones publicadas por entidades internacionales.

Algunos autores consideran como límite microbiológico aceptable en una superficie higienizada, un recuento inferior a 100 ufc/cm² (Davidson y cols., 1999). Este valor se aleja mucho de límite microbiológico establecido en este estudio (<3 ufc/cm²). Sin embargo, este límite, concuerda más con los límites publicados en una guía de monitorización de higiene de superficies, en la que se considera una superficie satisfactoria aquella que tiene un recuento de aerobios menor a 1,8 ufc/cm², un recuento moderado o aceptable entre 1,8-5 ufc/cm² y un recuento insatisfactorio superior a 5 ufc/cm² (Miettinen y cols., 2001).

3.3. Evaluación del estado higiénico de las superficies de trabajo

3.3.1. En función del día de ensayo

Los resultados mostraron que había diferencias estadísticas tanto en los recuentos bacterianos como en los valores de ATP (**Tabla 16**). Se observó que el primer ensayo fue el que cumpliría en término medio el límite microbiológico satisfactorio, así como el de ATP con solo un 21% de puntos de muestreo insatisfactorios. El tercer ensayo, tanto el recuento microbiológico como el de ATP estarían dentro del intervalo de aceptabilidad, con un 40% de puntos de muestreo insatisfactorios. Mientras que, el segundo ensayo fue el que presentó peores condiciones higiénicas de las superficies de trabajo, con recuentos bacterianos superiores al límite insatisfactorio, siendo el porcentaje de puntos de muestreo insatisfactorios de un 74% (**Tabla 16**).

Las diferencias del recuento microbiano entre días de ensayo se pueden atribuir a varios factores: la precisión y la reproducibilidad de las mediciones de los métodos en uso dependen de la habilidad manual de los operadores, la presión que ejercen sobre la superficie y de la

técnica de recuperación (Foschino y cols., 2003). Ocurre lo mismo en el caso del tratamiento de limpieza y desinfección (Troller, 1993).

Tabla 16. Nivel medio de contaminación microbiana y de ATP de las superficies en función del día de ensayo (media \pm desviación estándar).

Ensayo	Recuento en placa *	Valor ATP**
	Log (ufc/100 cm ²)	Log (RLU/100 cm ²)
Primero	1,54 ^a \pm 1,33	2,67 ^a \pm 0,65
Segundo	3,47 ^c \pm 0,90	3,02 ^b \pm 0,63
Tercero	2,51 ^b \pm 1,62	3,10 ^b \pm 0,91

^{a-c} Valores medios de la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

* Valor de referencia en el recuento en placa: 2,48-2,70 log ufc/100 cm² (300-500 ufc/100 cm²)

** Valor de referencia en el valor de ATP: 2,9-3,23 log RLU/100cm² (850-1700 RLU/100 cm²)

3.3.2. En función de la zona de muestreo

En función de la zona de muestreo se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto en los recuentos bacterianos, como en los valores de ATP (**Tabla 17**). Así, la zona de elaboración-ensado fue la que presentó recuentos bacterianos significativamente más altos (3,19 log ufc/100 cm²), probablemente asociado al tipo de material de las superficies de trabajo constituido mayoritariamente de polietileno articulado. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos mediante la técnica DEM en la zona de carne (menor recuento bacteriano) y la zona de elaborados. Sin embargo, en el caso de la cocina los resultados obtenidos son significativamente inferiores al recuento de células vivas obtenidas mediante DEM. Esta diferencia puede ser debida a las características ambientales de las distintas zonas. En concreto la cocina era una zona en la que la humedad relativa era más baja y la temperatura era más alta respecto a las otras zonas de trabajo. Estas condiciones favorecen el secado de las superficies de trabajo y por lo tanto, al igual que se observó en el experimento anterior, es posible que por la situación de estrés se favoreciera la presencia de microorganismos viables pero no cultivables (Rose y cols., 2003). Así como, también puede influir la variabilidad de la técnica de escobillado en la recuperación de microorganismos, especialmente en superficies secas y que se agrava más si la contaminación es media-baja (<1000 ufc/cm²) (Moore y Griffith, 2002b). En un estudio de recuperación de microorganismos sobre superficies de acero inoxidable húmedas y secas en las que se inoculó

Staphylococcus aureus y *Escherichia coli*, Davison y cols. (1999) obtuvieron niveles de recuperación mayores en superficies húmedas que en las secas. Por lo que, de acuerdo con estos autores, la humedad constante presente en las superficies de la zona de elaboración y envasado podía ser también una de las causas de mayor proliferación bacteriana.

En los resultados de ATP también se observaron diferencias significativas entre las zonas (**Tabla 17**). Así la zona de carne fue la que presentó valores significativamente más reducidos. Esto concuerda con los recuentos microbiológicos obtenidos aunque no se relaciona con la suciedad observada en el análisis de imagen (**Figuras 20b** y **20i**). En el caso de la zona de elaborados, la alta presencia de suciedad y el elevado recuento bacteriano coincide con las imágenes observadas en el microscopio (**Figura 21**). La zona de la cocina, además de estar sucia como ya se observó en el microscopio (**Figura 22a** y **22d**) entre la contaminación microbiana destacó una población importante de levaduras (**Figura 22h**) que pueden contener 100 veces más ATP que una célula bacteriana (Fung, 2002). También es posible que se encontrase un valor más elevado de ATP debido a la posible presencia de VBNC. Según Venkateswaran y cols. (2003) las VBNC tienen un contenido de ATP similar a las bacterias normales.

Tabla 17. Nivel medio de contaminación microbiana y de ATP de las superficies en función de la zona (media \pm desviación estándar).

Zona	Recuento en placa*	Valor ATP**
	Log (ufc/100 cm ²)	Log (RLU/100 cm ²)
Carne	1,80 ^a \pm 1,18	2,56 ^a \pm 0,70
Elaboración y envasado	3,19 ^b \pm 1,43	3,02 ^b \pm 0,64
Cocina	1,5 ^a \pm 1,21	3,23 ^b \pm 0,97
Total	2,48 \pm 1,52	2,98 \pm 0,76

^{a-b} Valores medios de la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

* Valor de referencia en el recuento en placa: 2,48-2,70 log ufc/100 cm² (300-500 ufc/100 cm²)

** Valor de referencia en el valor de ATP: 2,9-3,23 log RLU/100 cm² (850-1700 RLU/100 cm²)

El análisis individual por superficies de trabajo indicó que la superficie más contaminada de toda la planta era la mesa de manipulación 2 ubicada en la zona de elaborados (**Tabla 18**). Igualmente, el valor más alto de ATP se determinó en la cinta hacia túnel de secado también ubicada en la zona de elaborados (**Tabla 18**). Si bien la zona de elaborados fue la única que se apreciaron diferencias en el recuento bacteriano en las diferentes superficies de trabajo, en los

valores de ATP se observaron diferencias entre superficies de trabajo en cada una de las zonas.

Tabla 18. Nivel de contaminación microbiana y de ATP de todas las superficies de trabajo evaluadas mediante hisopado y recuento en placa y bioluminiscencia (media \pm desviación estándar).

Zona	ID	Superficies	Recuento en placa*	Valor ATP**
			Log (ufc/100 cm ²)	Log (RLU/100 cm ²)
Carne	1	cinta salida túnel congelación	1,87 ^a \pm 1,17	3,05 ^b \pm 0,46
	2	cinta envasadora 1	1,87 ^a \pm 1,05	2,25 ^a \pm 0,24
	3	mesa de despiece grande	1,83 ^a \pm 1,21	2,17 ^a \pm 0,47
	4	mesa de despiece pequeña	1,93 ^a \pm 1,43	2,51 ^a \pm 0,73
	5	mesa despiece con cajones	1,78 ^a \pm 1,21	3,25 ^b \pm 0,79
	6	sierra sala despiece	1,50 ^a \pm 1,21	2,09 ^a \pm 0,49
Subtotal			1,80 \pm 1,18	2,56 \pm 0,70
Elaboración y envasado	7	bañeras cefalópodos	3,18 ^b \pm 1,47	2,81 ^b \pm 0,43
	8	cinta llegada glaseadora	3,74 ^b \pm 2,14	3,67 ^d \pm 0,35
	9	cinta a túnel de secado	3,56 ^c \pm 1,70	3,81 ^e \pm 0,36
	10	cinta alineación	2,90 ^b \pm 1,36	3,02 ^b \pm 0,48
	11	cinta recogida producto sierra	3,46 ^b \pm 1,36	3,03 ^b \pm 0,46
	12	cinta salida túnel secado	3,04 ^b \pm 1,14	3,19 ^c \pm 0,64
	13	cinta a glaseadora grande	3,39 ^b \pm 0,46	2,43 ^b \pm 0,55
	14	cinta a glaseadora pequeña	3,83 ^b \pm 0,23	2,80 ^b \pm 0,06
	15	cinta envasadora 1	2,54 ^b \pm 1,35	2,62 ^b \pm 0,19
	16	cinta envasadora 2	2,84 ^b \pm 1,31	2,93 ^b \pm 0,38
	17	maquina lavado cefalópodos	3,52 ^b \pm 0,74	2,68 ^b \pm 0,57
	18	mesa manipulación 1	3,03 ^b \pm 2,02	3,22 ^c \pm 0,64
	19	mesa manipulación 2	4,57 ^c \pm 0,80	3,37 ^c \pm 0,23
	20	mesa manipulación 3	3,38 ^b \pm 1,46	3,20 ^c \pm 1,03
	21	sierra de corte pescado	1,80 ^a \pm 1,06	2,30 ^a \pm 0,27
Subtotal			3,19 \pm 1,43	3,02 \pm 0,64
Cocina	22	mesa microondas	1,74 ^a \pm 0,90	3,48 ^a \pm 0,77
	23	mesa preparación ingredientes	1,77 ^a \pm 0,96	2,71 ^a \pm 0,62
	24	mesa emplatado 1	1,10 ^a \pm 1,32	3,18 ^a \pm 1,02
	25	mesa emplatado 2	1,32 ^a \pm 1,34	3,39 ^a \pm 1,32
	26	mesa emplatado 3	1,60 ^a \pm 1,49	3,56 ^a \pm 1,13
Subtotal			1,51 \pm 1,21	3,23 \pm 0,97

^{a-c} Valores medios de la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

* Valor de referencia en el recuento en placa: 2,48-2,70 log ufc/100 cm² (300-500 ufc/100 cm²)

** Valor de referencia en el valor de ATP: 2,9-3,23 log RLU/100cm² (850-1700 RLU/100 cm²)

Al realizar la valoración en función del grado de satisfacción de las distintas zonas de la industria, se debe destacar que se realizó considerando los 4 puntos de muestreo realizados en cada una de las superficies de trabajo. Así, aunque el valor microbiológico medio de las mesas de manipulación de la cocina estaba dentro del límite de aceptabilidad, podía presentar puntos de muestreo de la misma superficie de trabajo insatisfactorios.

La zona de carne, en general, cumplió tanto el límite microbiológico satisfactorio como de ATP, siendo el porcentaje de insatisfactorios de un 24% a nivel microbiológico y un 11% en el nivel de ATP. La diferencia entre el porcentaje de insatisfactorios del recuento y del valor de RLU se relacionó más con la presencia de ATP en la suciedad que con la contaminación microbiana, dado que, solo un 2,8% de los puntos de muestro superó el nivel considerado como límite de detección (>7000 ufc/100 cm²) mediante bioluminiscencia (**Tabla 19**).

Finalmente, la zona de la cocina, la mayoría de puntos cumplieron con el límite microbiológico satisfactorio (sólo un 17% fueron insatisfactorios), mientras que en el valor de ATP el porcentaje de insatisfactorios fue del 50% (**Tabla 19**). La diferencia entre el porcentaje de insatisfactorios del recuento y del valor de RLU se relacionó de forma muy directa, como se mencionó anteriormente, con la presencia de suciedad, así como por el predominio de levaduras en la microbiota residente de la zona y la posible presencia de VBNC.

Tabla 19. Porcentaje de superficies de trabajo en función del límite microbiológico y valor de ATP establecido.

Zona	Técnica	Límites		
		satisfactorio (%)	aceptable (%)	insatisfactorio (%)
Carne	microbiología	71	5	24
	valor ATP	79	10	11
Elaboración y envasado	microbiología	28,6	2,9	68,5
	valor ATP	45,5	21,1	33,4
Cocina	microbiología	74,4	8,5	17,1
	valor ATP	23	27	50

Finalmente, la zona de la cocina, la mayoría de puntos cumplieron con el límite microbiológico satisfactorio (sólo un 17% fueron insatisfactorios), mientras que en el valor de

ATP el porcentaje de insatisfactorios fue del 50% (**Tabla 19**). La diferencia entre el porcentaje de insatisfactorios del recuento y del valor de RLU se relacionó de forma muy directa, como se mencionó anteriormente, con la presencia de suciedad, así como por el predominio de levaduras en la microbiota residente de la zona y la posible presencia de VBNC.

3.3.3. En función de tipo de material de las superficies

Del total de las 24 superficies de trabajo analizadas, el 32,38% eran de acero inoxidable, el 30,60% de polietileno articulado, el 24,20% de polietileno liso y el 12,81% de poliuretano/PVC.

Al realizar el estudio estadístico se observaron 3 grupos significativamente diferentes ($P < 0,05$) en el recuento bacteriano obtenido en las distintas superficies (**Tabla 20**). Las superficies que mostraron una contaminación bacteriana menor fueron las superficies de acero inoxidable (23% insatisfactorios), seguido de las de polietileno liso y PVC/poliuretano (42% insatisfactorios), finalmente la contaminación más elevada se determinó en las de polietileno articulado (70% puntos insatisfactorios) (**Tabla 21**). En el caso del polietileno liso, el porcentaje mayor de insatisfactorios se determinó en la zona de elaborados. En esta zona, las condiciones ambientales eran más húmedas y el material de las superficies, visualmente, estaba más deteriorado. El PVC/poliuretano presentó un reducido número de puntos insatisfactorios relacionados con el valor de ATP, probablemente debido a que en este tipo de superficies pasaba el producto ya envasado.

Tabla 20. Nivel de recuento microbiano en función de las características del material de la superficie (media \pm desviación estándar).

Tipo de Superficie	Recuento en placa *	Valor ATP**
	Log (ufc/100 cm ²)	Log (RLU/100 cm ²)
Polietileno liso	2,66 ^b \pm 1,61	2,89 ^a \pm 0,80
Acero inoxidable	1,72 ^a \pm 1,27	2,85 ^a \pm 0,92
Polietileno articulado	3,19 ^c \pm 1,46	3,18 ^b \pm 0,59
PVC/Poliuretano	2,42 ^b \pm 1,27	2,60 ^a \pm 0,39

^{a-c} Valores medios de la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

* Valor de referencia en el recuento en placa: 2,48-2,70 log (ufc/100 cm²) (300-500 ufc/100 cm²)

** Valor de referencia en el valor de ATP: 2,9-3,23 log (RLU/100cm²) (850-1700 RLU/100 cm²)

Tabla 21. Porcentaje de superficies de los distintos materiales en función del límite microbiológicos y valor de ATP establecido.

Zona	Técnica	Límites		
		satisfactorio (%)	aceptable (%)	insatisfactorio (%)
Acero inoxidable	microbiología	71,4	5,6	23
	valor ATP	50,5	30	29,5
Polietileno articulado	microbiología	29	1	70
	valor ATP	37	21	42
Polietileno liso	microbiología	53,9	4,1	42
	valor ATP	54,4	21,6	24
PVC/poliuretano	microbiología	52,8	4,2	43
	valor ATP	80,6	16,4	3

Las diferencias observadas entre los distintos materiales se pueden explicar en parte por sus características morfológicas, de diseño y vulnerabilidad (Holah y Thorpe, 1990). Así, el mayor recuento bacteriano y de ATP en las superficies de polietileno articulado probablemente fuese debido a la difícil accesibilidad a la hora de realizar una adecuada limpieza y desinfección. Cabe mencionar que la contaminación bacteriana presente en este tipo de superficie presentó una gran variabilidad en función del punto de muestreo, debido a que este tipo de superficies eran flexibles y generalmente suspendidas (tipo cortina), lo cual dificultaba también aplicar la técnica de hisopado con suficiente presión y constancia. Otro factor importante que contribuye en la efectividad de la limpieza es el acabado de las superficies. El recuento bacteriano y de ATP alto en las superficies de polietileno liso podía ser debido a las abrasiones y rayadas que dificultaron el proceso de limpieza (Holah y Thorpe, 1990). Por lo tanto, las características inherentes de los distintos materiales limitaron la limpieza y desinfección (Frank y cols., 1997). Resultados similares obtuvieron (Krysinski y cols., 1992) en un estudio que realizaron sobre la inactivación de *Listeria monocytogenes* adherida en superficies de acero inoxidable, poliéster y poliuretano mediante distintas sustancias limpiadoras y desinfectantes.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos, el material que presentó mejor calidad microbiológica fue el acero inoxidable. De acuerdo con Maukonen y cols. (2003), es el material más adecuado para una industria alimentaria por sus características físico-químicas y morfológicas ya que lo hacen un material muy resistente a las abrasiones, golpes, y a diferentes tratamientos químicos. Igualmente, coincidimos con Foschino y cols. (2003) que determinaron que la limpieza y desinfección sobre acero inoxidable es más eficiente que en el resto de superficies, ya que muestra una remarcable facilidad a la hora de despegarse las bacterias de la superficie antes de que se desarrolle un biofilm (Foschino y cols., 2003).

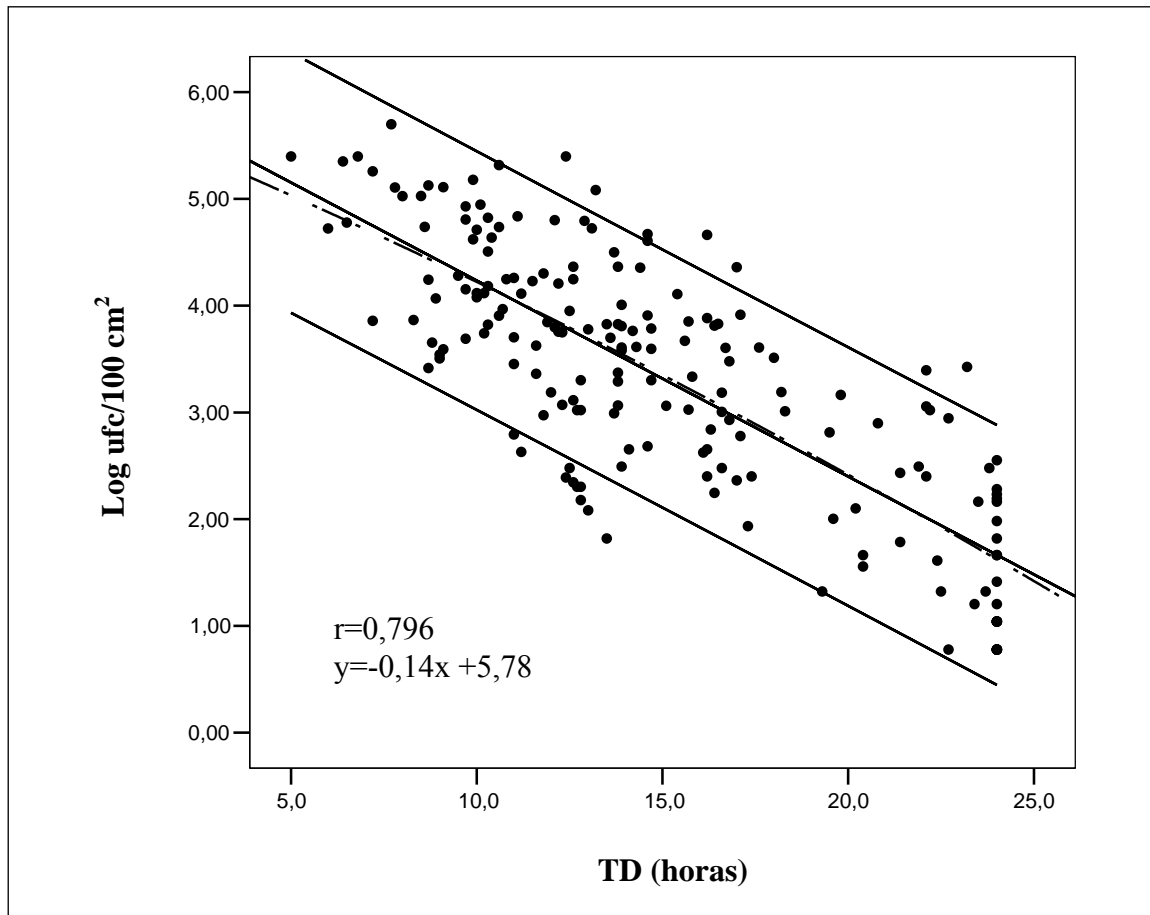
La información que se obtuvo sobre el estado higiénico de la industria mediante la técnica DEM, escobillado y valoración de ATP, fue suficiente para concluir que el plan de limpieza y desinfección estaba fallando, especialmente la etapa de la limpieza. Concretamente, sólo un 51% y un 48% cumplían los límites satisfactorios establecidos para el recuento microbiológico y el valor de ATP, respectivamente. Sin embargo, en otro estudio realizado en una industria de pescado se determinó un porcentaje ligeramente superior (61%), a pesar de que su límite satisfactorio era de 1,8 ufc/cm² (Miettinen y cols., 2001).

Finalmente, se recomendó revisar y modificar los procedimientos de higienización y los métodos de control con el fin de implantar medidas correctoras. Es esencial verificar la eficacia de las operaciones de limpieza regularmente con un método de control de la higiene adecuado y efectivo, en el que la determinación de la presencia de ATP podría utilizarse como método de elección y rápido para realizar la vigilancia de la limpieza y desinfección (Davison y cols., 1999). Aunque debería complementarse con los análisis microbiológicos especialmente en la zona de elaborados.

3.4. Aplicación de la técnica de impedancia

La **Figura 24** muestra los resultados obtenidos al realizar la calibración del recuento bacteriano respecto al tiempo de detección (TD) obtenido mediante la técnica de impedancia con el equipo Bactometer™. La relación entre ambas variables fue de tipo lineal presentando un coeficiente de correlación de 0,796 y altamente significativo ($P < 0,01$).

Figura 24. Recta de calibración del tiempo de detección (TD) respecto al recuento bacteriano log (ufc/100 cm²) recuperado de las superficies de trabajo (n=187).



Teniendo en cuenta los límites microbiológicos establecidos para el recuento bacteriano se determinaron los tiempos de detección equivalentes mediante la recta de calibración obtenida. Se determinó que el límite microbiológico satisfactorio (<2,48 log ufc/100 cm²) correspondía a un TD superior a 19,5 h, el límite microbiológico insatisfactorio (2,7 log ufc/100 cm²) correspondía a un TD inferior a 18 h y el límite de aceptable entre ambos valores. Por lo tanto, según estos resultados con la técnica de impedancia en menos de 24 h es posible valorar una superficie de trabajo como satisfactoria o insatisfactoria respecto a las 48 h, necesarias para recuento en placa.

La impedancia podría ser utilizada como un método rápido, simple y alternativo al método tradicional de recuento en placa para verificar la calidad higiénica de las superficies de trabajo tras la higienización. Además, la rapidez de resultados permitiría adoptar medidas correctoras lo antes posible en el caso que se detectasen superficies en condiciones microbiológicas

insatisfactorias que pudieran suponer un riesgo para salud o la recontaminación de un producto (Mosteller y Bishop, 1993; Holah y cols., 1998). Aunque estos instrumentos necesitan de un coste inicial elevado de la compra del equipo, el coste final del ensayo es menor si tenemos en cuenta el coste adicional de los medios y el trabajo del personal asociado a la preparación de la gran cantidad de placas en los métodos tradicionales (Russell, 2000). También se debería tener en cuenta, respecto a la problemática medioambiental, la minimización de residuos derivados de la técnica impedanciométrica.

3.5. Aislamiento e identificación de la microbiota tras la higienización de la planta

Se aislaron un total de 275 cepas en toda la industria de alimentos (**Tabla 22**). Siendo el porcentaje de Gram negativos del 71,7%, Gram positivos 19,6%, levaduras 8,8%, y un 12,7% de la cepas no fueron identificadas

Los resultados de la identificación indicaron que la microbiota remanente en las superficies de trabajo tras la limpieza y desinfección estaba formada principalmente por bacterias Gram negativas (71,7%). Dentro de este grupo, un 14,2% se clasificaron como enterobacterias. *Pseudomonas* spp. fue el género mayoritario con un 32,50% respecto al total de la microbiota aislada (**Tabla 22**). A las bacterias Gram negativas, concretamente al género *Pseudomonas* se les atribuye una mayor resistencia a los agentes químicos debido a la composición química de su pared celular (Wirtanen y cols., 2001a). Bagge-Ravn y cols. (2003b) determinaron en una industria de procesamiento de pescado que la microbiota Gram positiva disminuía significativamente tras la limpieza y desinfección, prevaleciendo las bacterias Gram negativas entre un 47-90%.

Tabla 22. Identificación de la microbiota adherida en las superficies de trabajo tras la limpieza y desinfección.

Gram	Géneros / grupos	Nº colonias	Porcentaje (%)
Negativas (71,7%)	<i>Aeromonas</i>	5	2,08
	<i>Brevundimonas</i>	6	2,50
	<i>Burkholderia</i>	10	4,17
	<i>Chryseobacterium</i>	4	1,67
	<i>Comamonas</i>	6	1,67
	<i>Enterobacter</i>	12	5,00
	<i>Escherichia</i>	2	0,83
	<i>Flavimonas</i>	11	4,58
	<i>Methilobacterium</i>	1	0,42
	<i>Moraxella</i>	3	1,25
	<i>Myroides</i>	2	0,83
	<i>Ochrobactrum</i>	2	0,83
	<i>Proteus</i>	1	0,42
	<i>Pseudomonas</i>	78	32,50
	<i>Serratia</i>	11	4,58
	<i>Sphingobacterium</i>	14	5,83
<i>Stenotrophomonas</i>	6	2,50	
Positivas (19,6%)	<i>Bacterias ácido lácticas</i>	5	2,08
	<i>Bacillus</i>	22	9,17
	<i>Kocuria</i>	3	1,25
	<i>Micrococcus</i>	5	2,08
	<i>Staphylococcus</i>	12	5,00
Otras (8,8%)	<i>Levaduras</i>	21	8,75
No identificadas		35	12,7
Total		275	100

La microbiota de las superficies es en parte un reflejo de la materia prima usada y de los parámetros de conservación utilizados para los productos alimentarios. La presencia de *Pseudomonas* (23-47%) y de levaduras (2-41%) fue determinada como microbiota dominante en un estudio realizado en 4 industrias de pescado después de la limpieza y desinfección (Bagge-Ravn y cols., 2003b). Estos resultados concuerdan con los observados en la zona de elaborados, en la cual se procesaba pescado (**Tabla 23**). En la zona de carne, la microbiota dominante fue *Pseudomonas* (40,58%) y otras bacterias Gram negativas (26,09%), relacionadas con el género *Flavobacterium* y *Moraxella*, que se relacionan directamente con la microbiota de la carne. También se determinó un porcentaje destacable de *Bacillus* que puede tener su origen tanto de la contaminación de la carne como del ambiente (Bacon y cols., 2000). Finalmente, en la zona de la cocina, destacó la presencia de *Pseudomonas* spp. (34,29%), asociada a los productos frescos y una elevada presencia de levaduras (22,86) asociada probablemente, a la manipulación de vegetales y leguminosas (Beuchat, 1998).

Tabla 23. Microbiota dominante después de la limpieza y desinfección en función de la zona de trabajo.

Género	Carne (%)	Elaboración (%)	Cocina (%)
Enterobacterias	5,80	8,88	17,14
<i>Pseudomonas</i> spp.	40,58	45,56	34,29
Otros Gram negativos	26,09	25,44	5,71
<i>Staphylococcus</i> spp.	10,14	5,33	2,86
<i>Bacillus</i> spp.	11,59	7,10	5,71
Levaduras	2,90	6,51	22,86
Otros Gram positivos	2,90	1,18	11,43

Los desinfectantes que se utilizaron en la industria fueron alcohol isopropílico e hipoclorito sódico al 25% en la zona de elaboración y envasado, y H₂O₂ al 50% combinado con nitrato de plata al 0,065% en la zona de carne y cocina. Holah y Thorpe (1990) concluyeron que los ensayos de eficacia de los desinfectantes en estudios de campo son ventajosos puesto que los agentes en cuestión son evaluados frente a la microbiota natural, sobretodo si las muestras son recogidas con especial cuidado y por la misma persona. Los resultados de nuestro estudio demostraron que a pesar de limpiar y desinfectar diariamente la industria, las superficies no estaban suficientemente desinfectadas.

La presencia predominante de *Pseudomonas* respecto al total de colonias aisladas, así como su presencia mayoritaria en zona de elaboración envasado, se podría explicar por el tipo de desinfectante utilizado (base alcohol) a diferencia del peróxido de hidrógeno utilizado en la zona de carne y cocina. En la bibliografía se señala que los desinfectantes que tienen como base alcohol son efectivos en ensayos con biofilms de *Pseudomonas* al ser analizados mediante el método tradicional, sin embargo, microscópicamente se ha observado que las bacterias sólo son desactivadas, sin ser destruidas, así que pueden recuperarse y formar de nuevo biofilms, mientras que los desinfectantes con base peróxido son efectivos contra los biofilms de este mismo género (Wirtanen y cols., 2001).

La presencia de *Pseudomonas* como género predominante es importante por su capacidad de formar biofilms, con el riesgo que implica su desprendimiento durante la producción con la posibilidad de contaminar el alimento (Boer y Beumer, 1999) y por su resistencia a una variedad importante de desinfectantes (Wirtanen y cols., 2001). Además el hipoclorito sódico, que se utilizó combinado con el alcohol, es rápidamente inactivado por la presencia de materia orgánica, lo que justificaría la ineficacia del desinfectante en la zona de elaboración y envasado (Chmielewski y Frank, 2003). Quizás la menor contaminación bacteriana determinada en la zona de carne y cocina, probablemente es debida a la mayor estabilidad del peróxido de hidrógeno en presencia de materia orgánica entre otros factores. Aunque favorece la supervivencia de bacterias o levaduras catalasa positivas que fueron las mayoritariamente aisladas en la cocina tras la desinfección (McDonell y Rusell, 1999). Las levaduras, en otros estudios, se han mostrado más resistentes a la limpieza y desinfección que la población bacteriana (Bagge-Ravn y cols., 2003).

Pseudomonas spp. es un género microbiano capaz de adherirse a las superficies con mucha facilidad en poco tiempo puede formar un biofilm (Bredholt y cols., 1999). Por otro lado, tanto las Pseudomonádaceas, como las levaduras sobreviven bastante bien a la escasez de nutrientes y además son resistentes los desinfectantes, especialmente a los ácidos (Wirtanen y cols., 2001b)

La presencia de *Bacillus* es un problema para la industria de alimentos porque sus esporas (endosporas) son difíciles de eliminar de las superficies (Bredholt y cols., 1999). Además los desinfectantes con base alcohólica como el que se utilizó en la zona de elaborados tampoco son efectivos contra las esporas (Wirtanen y cols., 2001a).

Sphingobacterium multivorum, uno de los géneros aislados en este estudio, se ha observado que forman biofilms junto a otros microorganismos (*Proteus vulgaris* y *Pseudomonas putida*) en bandejas plásticas de policarbonato en refrigeradores de ambientes alimentarios a partir de residuos de carne y vegetales (Michaels y cols., 2002). También, *Serratia liquefaciens* es comúnmente encontrada en el pescado ahumado frío envasado al vacío (González y cols., 2002).

Entre los microorganismos identificados que raramente son causantes de enfermedades generadas por alimentos, están: *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus spp.* y *Pseudomonas aeruginosa* (Vanne y cols., 1996). Dichos microorganismos fueron encontrados en muy baja proporción. A pesar de que no se aislaron microorganismos patógenos, la presencia de enterobacterias y hongos se han recomendado como microorganismos indicadores de la presencia de patógenos en superficies (Bagge-Ravn y cols., 2003b).

La desinfección es una etapa necesaria en las industrias de elaboración y distribución de alimentos, especialmente en las áreas húmedas, ya que se favorece el crecimiento de microorganismos. El objetivo de un desinfectante es reducir el número de microorganismos viables que permanecen en las superficies de contacto con alimentos. La eficacia de muchos de los desinfectantes se ve interferida por la presencia de materia orgánica, por cambios de pH y temperatura, así como por la concentración y el tiempo de contacto del desinfectante con la superficie (Holah, 1992; Mosteller y Bishop, 1993). Tras la aplicación continuada de un desinfectante suele apreciarse que las superficies no sólo no se desinfectan bien, sino que en ocasiones se produce un incremento del número de bacterias debido a cambios estructurales que conllevan a respuestas de tipo adaptativo que en determinadas ocasiones pueden incrementar la posibilidad de la presencia de patógenos (Lunden y cols., 2003). Además el poder desinfectante de un producto difiere entre cepas adaptadas y/o persistentes en las superficies con respecto a las no adaptadas. Esta situación es especialmente evidente en el caso de *Listeria monocytogenes* en relación con los amonios cuaternarios y las alquilaminas terciarias. Estudios recientes han demostrado que tras una exposición subletal de 2 horas, la concentración necesaria para destruir a este tipo de bacteria se incrementa en 3 veces (Taormina y Beuchat, 2001). Para minimizar la aparición de éstos fenómenos adaptativos es importante que se realice un buen empleo de los desinfectantes a las concentraciones y tiempos de contacto adecuados, evaluados en las condiciones más adversas como sería la presencia de biofilms adheridos en una superficie (Wirtanen y cols., 2001a). Es igualmente

recomendable cambiar periódicamente los desinfectantes utilizados con el fin de evitar que se produzcan fenómenos adaptativos cruzados entre sustancias que, siendo diferentes, tengan el mismo mecanismo de acción (Lunden y cols., 2003).

4. Aplicación de tratamientos de descontaminación en superficies vivas (piel de vacuno)

4.1. Efecto del Tween 20 combinado con un desinfectante en la descontaminación de la piel de vacuno inoculado con *E. coli* O157:H7.

En los últimos años, se ha observado una creciente prevalencia de *E. coli* O157:H7 en el ganado vacuno que ha obligado a las autoridades norteamericanas a realizar distintas intervenciones para su control (Bacon y cols., 2000). Estos animales, habitualmente son portadores asintomáticos de *E. coli* O157:H7 (Letellier y cols., 1999). Durante el desollado, los microorganismos patógenos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* se transfieren de la piel, la cual posee elevadas cargas de dichas bacterias, a la canal (Arthur y cols., 2004). El plan de APPCC, implantado en la mayoría de mataderos de Estados Unidos, está dirigido hacia la descontaminación de canales mediante la combinación de distintos tratamientos, incluyendo duchado con vapor subatmosférico, duchado con ácidos orgánicos, y combinación de vapor con duchado con agua caliente (Sofos y cols., 1999). Entre los distintos tratamientos con sustancias antimicrobianas, los ácidos orgánicos son los que han tenido mayor interés en la descontaminación de canales, ya que se consideran sustancias seguras (Dorsa y cols., 1997). Aunque, también están autorizadas otras sustancias como el hidróxido sódico, el fosfato trisódico, el ácido fosfórico y el cloro (Bacon y cols., 2000).

En este estudio se utilizó el ácido láctico (AL), así como una base fuerte como es el hidróxido sódico (HS), para evaluar la eficacia de varias combinaciones de estas sustancias con Tween 20 (TW20) al 5% en la descontaminación de piel de vacuno inoculada con *E. coli* O157:H7 bajo condiciones experimentales. No obstante, estas condiciones simulaban las condiciones reales de descontaminación de canales sobretodo en cuanto a los tiempos de contacto, 7 segundos según las indicaciones de la *Food Safety Inspection Service* (FSIS, Anónimo 1996).

Algunos autores, han demostrado que el Tween 20 al 5%, utilizado como tratamiento previo al ácido láctico, produce un efecto sinérgico sobre el ácido aumentando su eficacia de reducción de *E. coli* O157: H7. Además el Tween parece ser que podría prevenir la adhesión de la bacterias por sus características surfactantes e hidrofobicidad, para así hacerlas más vulnerables a la acción del desinfectante (Calicioglu y cols., 2002).

La **Tabla 24** muestra los resultados de los distintos tratamientos de descontaminación aplicados. Se observó una reducción significativa ($P < 0,05$) del patógeno cuando se aplicaron los desinfectantes, en relación a las muestras tratadas únicamente con agua o Tween 20 (**Tabla 24**). El nivel de inoculación inicial de *E. coli* O157: H7 fue de 6,7 log (ufc/cm²) y los niveles de reducción decimal fueron de entre 2 y 3 log (ufc/cm²). En las tres concentraciones evaluadas y en los tratamientos con AL y TW20+AL, la reducción decimal no fue estadísticamente diferente ($P \geq 0,05$). Sin embargo, en los tratamientos con HS, se obtuvo una mayor reducción decimal en las concentraciones del 2 y 3% y en el tratamiento con TW20+HS sólo a la concentración del 2% (**Tabla 24**).

La acción del Tween 20 no potenció significativamente la acción antibacteriana ni del AL ni del HS. Esto puede ser debido a que la concentración de Tween 20 evaluada no fue la más adecuada, teniendo en cuenta que había una cantidad importante de sustancias interferentes como era la materia fecal, el pelo y la piel de los animales (Sofos y Smith, 1998). Existen muchos factores que influyen sobre la actividad de las sustancias activas de los antimicrobianos. Entre ellos destacan la temperatura de aplicación de los productos, la temperatura de contacto con el microorganismo evaluado, la presencia de sustancias interferentes (materia orgánica y/o inorgánica), efectos de la formulación y la naturaleza y el tipo de microorganismo evaluado (Holah, 1995a).

Los resultados obtenidos no concuerdan con los obtenidos por Calicioglu y cols. (2002), que observaron que el Tween 20 tenía un efecto sinérgico sobre la acción del desinfectante. Aunque puede justificarse porque el estudio se efectuó sobre superficies más limpias y accesibles como canales de bovino o piel de pollo (Tamblyn y Conner, 1997).

Respecto a los recuentos de la microbiota residente de la piel, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0,05$) en los valores de reducción decimal obtenidos con ambas sustancias antibacterianas con y sin Tween 20. Los niveles de reducción decimal fueron de 1-2 log (ufc/cm²) en relación a las muestras control (resultados no mostrados).

Tabla 24. Eficacia del ácido láctico y del hidróxido sódico con y sin Tween 20, en la reducción decimal de *E. coli* O157:H7* inoculado en piel de vacuno (media \pm desviación estándar).

Tratamiento descontaminación	Concentración	Sin Tween 20	Con Tween 20
Agua		0,19 ^a \pm 0,48	0,19 ^a \pm 0,48
Tween 20	5%	0,42 ^a \pm 0,91	0,42 ^a \pm 0,91
Acido láctico (AL)	5%	2,12 ^b \pm 0,57	3,13 ^b \pm 1,19
	7,50%	2,74 ^b \pm 0,84	2,22 ^b \pm 0,42
	10%	2,96 ^b \pm 1,03	3,01 ^b \pm 1,02
Hidroxido sódico (HS)	1,50%	2,19 ^b \pm 0,54	2,12 ^b \pm 0,46
	2%	2,84 ^c \pm 0,25	2,95 ^c \pm 0,45
	3%	2,79 ^c \pm 0,54	2,44 ^b \pm 0,62

^{a-c} Valores medios de la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

*Inóculo con 5 cepas salvajes de *E. coli* O157:H7 rifampicina resistentes

Para evaluar la microbiota residente tras el proceso de descontaminación se hizo una identificación bacteriana preliminar. Se aislaron 81 cepas, a las cuales se hicieron pruebas bioquímicas básicas (prueba de la catalasa, oxidasa y del KOH). Los resultados obtenidos (Tabla 25) mostraron que 55 cepas (68%) eran bacterias Gram positivas y la mayoría de ellas catalasa y oxidasa positivas (93%), por lo que se les hizo la tinción de esporas y se observaron en el microscopio. En 90% de las muestras teñidas, fueron esporas, que se clasificaron dentro del género *Bacillus*. El 10% restante, no formaron esporas y por lo tanto, se clasificaron como bacilos Gram positivos no esporulados susceptibles de pertenecer al género *Micrococcus* o *Staphylococcus*. Para ello, el siguiente paso fue sembrar las colonias no esporiformes en un medio selectivo para *S. aureus* a 37°C durante 24h. Tras la incubación se observaron colonias típicas de *S. aureus*. El 7% restante de bacterias Gram positivas eran catalasa negativas y por lo tanto los posibles géneros podrían ser *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus* y *Lactobacillus*.

Solamente se identificaron 26 cepas Gram negativas y la mayoría eran catalasa y oxidasa positivas (65%), probablemente se trataban de bacterias que pertenecían al género de *Alcaligenes* o *Pseudomonas*. El porcentaje restante de bacterias Gram negativas eran catalasa

positivas y oxidas negativas (35%) pertenecientes probablemente a la familia de las Enterobacterias (**Tabla 25**).

Tabla 25. Microbiota aislada de la piel tras la descontaminación.

Características de la pared celular	Género	Colonias	
		Nº	%
Gram Negativas (26; 32%)	Enterobacterias	9	11
	<i>Pseudomonas</i>	17	21
Gram Positivas (55; 68%)	<i>Bacillus</i> *	46	57
	Micrococaceas*	5	6
	Otras**	4	5
Total		81	100

**Catalasa y oxidasa positivas*

***Catalasa negativas*

La clasificación preliminar de la microbiota residente de la piel una vez descontaminada con agentes químicos, nos dio una idea del tipo de microorganismos más resistentes a los desinfectantes combinados o no con Tween 20. Claramente se observó que las esporas fueron las formas predominantes en la piel de vacuno (57%), seguido de *Pseudomonas spp.* aunque en menor proporción (Holah, 1995b) (**Tabla 25**). La microbiota presente se relaciona con el ambiente, la flora residente de la propia piel, así como de las heces (Sofos y cols., 1999). La presencia elevada de esporas tras la descontaminación justifica la baja eficacia de los desinfectantes evaluados, teniendo en cuenta que estas formas bacterianas son resistentes a la actividad de muchas sustancias antibacterianas (Grönholm y cols., 1999).

Como consecuencia de que no se obtuvieron reducciones de *E. coli* O157:H7 importantes con los desinfectantes aplicados durante 7 segundos, se evaluó su efecto a las concentraciones más elevadas aplicando un tiempo de contacto de 0, 60 y 120 segundos antes de realizar el aclarado final con agua.

Los tratamientos con AL o HS con o sin TW20 produjeron reducciones de *E. coli* O157:H7 significativamente superiores respecto a las muestras control tratadas con agua. El duchado con agua durante un tiempo más prolongado no incrementó significativamente la reducción del patógeno.

Cuando se aplicó AL aumentó significativamente su eficacia al incrementar el tiempo de contacto. Cabe mencionar que la variabilidad en los resultados fue inferior a la obtenida en el estudio anterior., Aunque, en realidad la reducción bacteriana tanto a 60 como 120 segundos (**Tabla 26**) fue similar a la obtenida a los 7 segundos (**Tabla 24**). Sin embargo, al aplicar el HS con o sin TW20, la reducción bacteriana aumentó significativamente en los tiempos de 60 y 120 segundos con valores superiores a 4 log (ufc/cm²). La aplicación del TW20 presentó menor eficacia antimicrobiana probablemente debido al efecto del pH. El pH del Tween 20 era ligeramente ácido y estaba entorno a 4,88, sin embargo el pH del HS era alcalino, entorno a 12,31. Por lo que la combinación de ambas sustancias produjo una solución con un pH próximo a la neutralidad y en consecuencia probablemente causó una disminución de la actividad bactericida del HS.

El tratamiento de descontaminación más efectivo y recomendable se correspondió a la aplicación de HS al 3% durante 60 segundos en la que se obtuvo una reducción superior a 6 log (ufc/cm²) (**Tabla 26**). La elevada efectividad a los 60 segundos supondría una ventaja importante a la hora de su implantación a nivel real. En un matadero la velocidad de sacrificio de los animales juega un papel económico muy importante puesto que, cuanto mayor es la velocidad de sacrificio mayor es el número de canales obtenidas por hora. Por lo tanto, acortar un minuto el tiempo de espera entre la aplicación del desinfectante y el aclarado del mismo con agua es fundamental para optimizar y rentabilizar al máximo la descontaminación de la canal a una velocidad adecuada para el matadero (Stopforth y cols., 2002).

Respecto a los recuentos de la microbiota natural, al igual que en el estudio anterior, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en los valores de reducción decimal obtenidos con ambas sustancias antibacterianas con o sin TW20 y entre los diferentes tiempos de contacto. Los niveles de reducción decimal fueron de 1-2 log (ufc/cm²) en relación a las muestras control (resultados no mostrados). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bosilevac y cols. (2004), que observaron que al aplicar cloruro de cetilpiridinio al 1% (CPC) en diferentes tiempos de contacto (desde 30 segundos hasta 4 horas) sólo consiguieron reducir la población de bacterias aerobias y enterobacterias en 1,5 log (ufc/100 cm²).

Tabla 26. Efecto de diferentes tiempos de espera sobre la reducción del recuento de *E. coli* O157:H7 (media \pm desviación estándar).

Cepa	Tiempo contacto	Control		Sin Tween 20		Con Tween 20	
		Agua		10% AL	3% HS	10% AL	3% HS
<i>E.coli</i> O157:H7*	0 s	0,13 ^a \pm 0,06	1,47 ^a \pm 0,12	3,87 ^a \pm 0,82	1,90 ^a \pm 0,20	2,36 ^a \pm 0,70	
	60 s	0,50 ^b \pm 0,27	2,04 ^b \pm 0,40	6,41 ^b \pm 0,70	2,48 ^a \pm 0,31	4,34 ^b \pm 1,53	
	120 s	0,48 ^b \pm 0,15	2,53 ^c \pm 0,36	6,70 ^b \pm 0,00	1,90 ^a \pm 0,85	5,18 ^b \pm 1,31	

AL: ácido láctico; HS: hidróxido sódico; TW20: Tween 20

^{a-c} Valores medios de la misma columna con diferente letra minúscula son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

*Inóculo con 5 cepas salvajes de *E. coli* O157:H7 rifampicina resistentes

McEvoy y cols. (2001) observaron una relación entre la piel sucia y la presencia de bacterias patógenas en las canales, sugiriendo que la aplicación buenas prácticas de higiene durante el desollado mejorarían la calidad higiénica de las canales. También, Reid y cols. (2002) al examinar la presencia de microorganismos patógenos en la piel del ganado vacuno, determinaron que la zona de la falda era la que presentaba mayor carga microbiana, por lo que sugirieron que esta parte podría actuar como fuente de contaminación cruzada durante el desollado. Igualmente, Arthur y cols. (2004) describieron una relación directa entre la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en la piel y en la canal. Por lo tanto, la aplicación de un tratamiento de descontaminación eficaz sobre la piel antes del sacrificio debería reducir la presencia de bacterias en la canal.

Sin embargo, según Mies y cols. (2004) la descontaminación de la piel antes del desollado mediante el duchado con o sin antimicrobianos tales como el ácido láctico y cloro no reducen significativamente los recuentos de bacterias en la piel. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en este estudio puesto que el tratamiento con ácido láctico produjo una reducción significativa de *E. coli* O157:H7, correspondiente a aproximadamente 2 log (ufc/cm²), respecto a las muestras tratadas con agua.

Los tratamientos de descontaminación de la piel que parecen ser más efectivos son el depilado químico, el tratamiento con (CPC), y los tratamientos con presión de vapor subatmosférico (Bosilevac y cols., 2005). Sin embargo, algunos tratamientos potenciales

pueden no ser prácticos o pueden no ser aprobados para el uso en planta. Se ha observado que pasos secuenciales de lavado con agua incrementan la eficacia de los tratamientos antimicrobianos (Bacon y cols., 2000). El aclarado elimina los restos de materia orgánica, sustancias químicas y reduce la cantidad de bacterias que podrían llegar más tarde a la canal, a la vez que reduce la exposición de sustancias tóxicas a los operarios (Castillo y cols., 1998).

La elección de sustancias antimicrobianas para la descontaminación de pieles depende del coste, la fácil implementación y la eficacia (Stopforth y cols., 2002). A partir de esta combinación de factores y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio se puede recomendar el tratamiento con hidróxido de sódico al 2% durante un tiempo de contacto de 60 segundos seguido del aclarado con agua, como método de elección en la descontaminación de canales. No obstante, el lavado de animales previo al sacrificio no se ha estudiado suficientemente a nivel real como para sacar conclusiones relevantes en cuanto a su eficacia o ineficacia y su viabilidad de implantación en los mataderos, aunque *a priori* los investigadores apuestan por seguir trabajando y profundizando más para su futura aplicación (Sofos, 2002; Bosilevac y cols., 2005).

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La microscopia de epifluorescencia directa combinada con la aplicación de tinciones de viabilidad, se ha mostrado como una técnica más rápida, fiable y precisa que el método tradicional de recuento en placa para la evaluación del estado vital de las bacterias tras un proceso de desecación y/o higienización, así como para la posible detección de biofilms adheridos a las superficies.
2. *E. cloacae*, *P.aeruginosa* y *S.aureus* se desarrollan rápidamente en superficies en condiciones húmedas alcanzando recuentos de 10^6 ufc/cm² a las 6 horas y formando biofilms a las 24 horas. Sin embargo el secado de las superficies es una medida eficaz, para eliminar o minimizar la proliferación bacteriana. *S. aureus* tiene la capacidad de sobrevivir, al menos durante tres días en superficies secas, que puede incrementar la probabilidad de contaminación cruzada de los alimentos.
3. La recuperación de *L. monocytogenes* en superficies secas mediante la técnica de escobillado es superior al 98% cuando el recuento en placa es superior a 1,8 log (ufc/cm²) aplicando tanto técnicas de homogenización mecánica como el Pulsifier. Sin embargo, con esta técnica se produce una infraestimación de al menos 1 logaritmo en relación al recuento obtenido mediante DEM debido a la posible presencia de bacterias en un estado de viables pero no cultivables y por tanto, a pesar de que son bacterias metabólicamente activas no son capaces de crecer en los medios de cultivo.
4. La impedancia podría ser utilizada como un método rápido, simple y alternativo al método tradicional de recuento en placa para verificar la calidad higiénica de las superficies de trabajo tras la higienización, que puede ser optimizado si se analiza directamente el hisopo. Además, la rapidez de resultados permitiría adoptar medidas correctoras lo antes posible en el caso que se detectasen superficies en condiciones microbiológicas insatisfactorias que pudieran suponer un riesgo para salud o la recontaminación del producto.

5. La técnica de bioluminiscencia en condiciones experimentales es un método válido, rápido y preciso para evaluar la contaminación microbiana en superficies. Sin embargo, cuando es aplicado en la industria alimentaria muestra una gran variabilidad en relación al recuento microbiano debido a la presencia de materia orgánica así como de otros inhibidores. La determinación de ATP podría utilizarse como un método rápido de elección para realizar la vigilancia de la limpieza y desinfección en la industria de congelados estudiada, aunque debería complementarse con análisis microbiológicos especialmente en la zona de elaborados.
6. La aplicación de discos de acero inoxidable en una industria alimentaria como reflejo real de las superficies de trabajo y su análisis mediante microscopia de epifluorescencia permite realizar la evaluación directa tanto de la suciedad como de la contaminación microbiana en forma viable y no viable, así como la formación de biofilms
7. Para la evaluación y verificación del plan de limpieza y desinfección de la industria de congelados se ha propuesto como límite crítico de ATP y microbiológico, los valores de 850 RLU/100 cm² y 300 ufc/100 cm², respectivamente. Atendiendo a estos criterios sólo un 48% y un 51% de las superficies de trabajo cumplían estos límites, respectivamente.
8. La zona más contaminada a nivel microbiológico fue la de elaboración, debido al tipo de material de las superficies constituido mayoritariamente por polietileno articulado y a las condiciones ambientales de elevada humedad. La zona con un alto valor medio de ATP fue la cocina asociado a la suciedad, a la presencia de levaduras, y a la posible presencia de VBNC debido a las condiciones ambientales de menor humedad relativa.
9. En el industria de congelados la microbiota persistente tras el proceso de limpieza y desinfección fue: *Pseudomonas* de forma generalizada, *Flavobacterium* y *Moraxella* y *Bacillus* en la zona de carne, *Enterobacter* y *Serratia* en la zona de elaborados y levaduras en la zona de cocina.

10. Para la descontaminación de piel de vacuno inoculada con *E. coli* O157: H7, el Tween 20 no ejerce un efecto sinérgico en la actividad antibacteriana del ácido láctico ni del hidróxido sódico. El tratamiento de descontaminación más efectivo se obtuvo con hidróxido de sódico (2%) durante un tiempo de contacto de 60 segundos seguido del aclarado con agua. Sin embargo este tratamiento fue insuficiente para la reducción de la microbiota habitual de la piel debido a la presencia de residuos orgánicos y un gran número de esporas bacterianas.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S. y Rorvik, L. 2000. Occurrence and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 62, 57-63.

Anónimo. 1996. Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems. *Federal Register* 61, 38805-38855.

Anónimo. 1997a. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1). *AENOR, UNE-EN 1040*, 1-30.

Anónimo. 1997b. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad fungicida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1). *AENOR, UNE-EN 1275*, 1-30.

Anónimo. 1998a. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria en el hogar y en la colectividad. Métodos de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1). *AENOR, UNE-EN 1276*, 1-35.

Anónimo. 1998b. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria en el hogar y en la colectividad. Métodos de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1). *AENOR, UNE-EN 1650*, 1-35.

Anónimo. 2001. Decisión de la Comisión 2001/471/CE por la que se establecen normas para los controles regulares de la higiene realizados por los explotadores de establecimientos de carnes frescas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L165/48-53.

Anónimo. 2002. Actividad bactericida y/o fungicida en superficies. Ensayo cuantitativo de superficies no porosas para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo sin acción mecánica y requisitos - Fase 2/etapa 1). *AENOR, UNE-EN 13697*, 1-35.

Anónimo. 2005. REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 DE LA COMISIÓN, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* 1-26.

Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Nou, X., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Kent, M.P., Jaroni, D., Pauling, B., Allen, D.M. y Koochmaraie, M. 2004. *Escherichia coli* O157 Prevalence and Enumeration of Aerobic Bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at Various Steps in Commercial Beef Processing Plants. *Journal of Food Protection* 67, 658-665.

Bacon, R.T., Belk, K.E., Sofos, J.N., Clayton, R.P., Reagan, J.O. y Smith, G.C. 2000. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. *Journal of Food Protection* 63, 1080-1086.

Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L. y 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*. *Journal of Food Protection* 66, 592-598.
- Bagge-Ravn, D., Yin, N., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C. y Gram, L. 2003b. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries--analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology* 87, 239-250.
- Besnard, V., Federighi, M. y Cappelletti, J.M. 2000. Evidence of Viable But Non-Culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiology* 17, 697-704.
- Beuchat, L.R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: A review. Report WHO/FSF/FOS/98.2. Food Safety Unit, WHO
- Bishop, P.L. 1997. Biofilm structure and kinetics. *Water Science Technology* 36, 287-294.
- Bloomfield, S.F., Arthur, M., Looney, E., Begun, K. y Patel, H. 1991. Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Letters in Applied Microbiology*, 233-237.
- Boer, E. y Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 50, 119-130.
- Bosilevac, J.M., Arthur, T.M., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Rossman, M., Reagan, J.O. y Koohmaraie, M. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* are reduced when hides are washed and treated with cetylpyridinium chloride at a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection* 67, 646-650.
- Bosilevac, J.M., Nou, X., Osborn, M.S., Allen, D.M. y Koohmaraie, M. 2005. Development and Evaluation of an On-Line Hide Decontamination Procedure for Use in a Commercial Beef Processing Plant. *Journal of Food Protection* 68, 265-272.
- Boulangé-Peterman, L. 1996. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. *Biofouling* 10, 275-300.
- Boulangé-Peterman, L., Rault, J. y Bellon-Fontaine, M.N. 1997. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling* 11, 201-216.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. y Desjardins, R. 1999. LIVE/DEAD. BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37, 77-86.
- Bower, J. 1997. Statistics for food science V: comparison of many groups. *Nutrition of Food Science* 2, 78-84.
- Bower, C.K. y Daeschel, M.A. 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology* 50, 33-44.

- Boyd, R.D., Cole, D., Rowe, D., Verran, J., Paul, A.J. y West, R.H. 2001. Cleanability of soiled stainless steel as studied by atomic force microscopy and time of flight secondary ion mass spectrometry. *Journal of Food Protection* 64, 87-93.
- Bredholt, S., Maukonen, J., Kujanpää, K., Alanko, T., Olofson, U., Husmark, U. y Sjöberg, A.M. 1999. Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces cleaned in a low-pressure system. *European Food Research and Technology* 209, 145-152.
- Breeuwer, P. y Abee, T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology* 55, 193-200.
- Bunthof, C.J., van den Braak, S., reeuwer, P., ombouts, F.M. y bee, T. 1999. Rapid Fluorescence Assessment of the Viability of Stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3681-3689.
- Calicioglu, M., Kaspar, C.W., Buege, D.R. y Luchansky, J.B. 2002. Effectiveness of spraying with Tween 20 and lactic acid in decontaminating inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and indigenous *Escherichia coli* biotype I on beef. *Journal of Food Protection* 65, 26-32.
- Caro, A., Got, P., Lesne, J., Binard, S. y Baleux, B. 1999. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3229-3232.
- Carpentier, B. y Cerf, O. 1993. Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal Applied of Bacteriology* 75, 499-511.
- Castillo, A., Lucia, L.M., Goodson, K.J., Savell, J.W. y Acuff, G.R. 1998. Comparison of water wash, trimming, and combined hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carcasses. *Journal of Food Protection* 61, 823-828.
- Champiat, D., Matas, N., Monfort, B. y Fraass, H. 2001. Applications of bioluminescence to HACCP. *Luminescence* 16, 193-198.
- Chmielewski, R.A.N. y Frank, J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 22-32.
- Cogan, T.A., Bloomfield, S.F. y Humphrey, T.J. 1999. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Letters in Applied Microbiology* 29, 354-358.
- Collado, M.J. 1994. Métodos de control de desinfectantes. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 7, 81-85.
- Corbitt, A.J., Bennion, N. y Forsythe, S.J. 2000. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Letters in Applied Microbiology* 30, 443-447.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. y Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49, 711-745.

- Cox, L.J., Kleiss, T., Cordier, J.L., Cordellanac, C., Konkel, P., Pedrazzini, C., Beumer, R. y Siebenga, A. 1989. *Listeria* spp. in food processing, non-food, and domestic environments. *Food Microbiology* 6, 49-61.
- Davey, M.E. y O'toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews* 847-867.
- Davidson, C.A., Griffith, C.J., Peters, A.C. y Fielding, L.M. 1999. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-DATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence* 14, 33-38.
- DeBeer, D., Srinivasan R. y Stewart, P.S. 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied Environmental Microbiology* 60, 4339-4344.
- Dorsa, W.J., Siragusa, G.R., Cutter, C.N., Berry, E.D. y Koohmaraie, M. 1997. Efficacy of using a sponge sampling method to recover low levels of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and aerobic bacteria from beef carcass surface tissue. *Food Microbiology* 14, 63-69.
- Duffy E A, LeValley S B, Belk K E, Sofos J N y Smith G C. 2000. Pre-harvest management practices, good manufacturing practices during harvest, and microbiological quality of lamb carcasses. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 20, 753-792.
- Duran, G.M. y Marshall, D.L. 2002. Rapid determination of sanitizer concentration using impedance-based methods. *Journal of Food Protection* 65, 1422-1427.
- Edmiston, A.L. y Russell, S.M. 1998. A rapid microbiological method for enumerating *Escherichia coli* from broiler chicken carcasses. *Journal of Food Protection* 61, 1375-1377.
- Else, T.A., Pantle, C.R. y Amy, P.S. 2003. Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5006-5010.
- Flemming, H. 1999. Methods for Investigation of Biofilms. *Microbially Influenced Corrosion of Industrial materials-Biocorrosion network- 02*.
- Fonnesbech V., Huss, H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. y Gram, L. 2001. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2586-2595.
- Foong, S.C. y Dickson, J.S. 2004. Survival and Recovery of Viable but Nonculturable *Listeria monocytogenes* Cells in a Nutritionally Depleted Medium. *Journal of Food Protection* 67, 1641-1645.
- Foschino, R., Picozzi, C., Civardi, A., Bandini, M. y Faroldi, P. 2003. Comparison of surface sampling methods and cleanability assessment of stainless steel surfaces subjected or not to shot peening. *Journal of Food Engineering* 60, 375-381.
- Frank, J.F. y Koffi, R.A. 1990. Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection* 53, 550-554.

- Frank, J.F., Chmielewski y R.A.N. 1997. Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. *Journal of Food Protection* 60, 1-6.
- Frank, J.F. y Chmielewski, R.A.N. 2001. Influence of surface finish on the cleanability of stainless steel. *Journal of Food Protection* 64, 1178-1182.
- Fung, D.Y.C. 2002. Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1, 3-22.
- Gant, V.A., Warners, G., Philips, I. y Savidge, G.F. 1993. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *Journal of Medical Microbiology* 39, 147-154.
- García, F. 1988. Factores que intervienen en la higienización de la industria cárnica. *Cárnica* 2000. 7, 59-61.
- García, A. 1989. Programa de limpieza e higiene. *Alimentaria* 3, 29-50.
- García, D., Gomez, N., Manas, P., Condon, S., Raso, J. y Pagan, R. 2005. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology* 99, 94-104.
- Geonaras, I. y Sofos, J. 2004. Combining Physical and Chemical Decontamination Interventions for Meat. In *Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.* ed. Sofos J.N.
- Gibson, H., Elton, R., Peters, W. y J.T.Holah. 1995. Surface and suspension testing: conflict or complementary. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 375-384.
- Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E. y Holah, J.T. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 87, 41-48.
- González, M., Sanz, J. y Santos, J. 2002. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *International Journal of Food Microbiology* 77, 161-168.
- Gonzalez, M. y Gonzalez-Fandos, E. 2004. Decontamination of poultry as a method for improvement in microbiology quality and shelf life. *Buletin USAMV-CN*, 60.
- Gracias, K.S. y McKillip, J.L. 2004. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal Microbiology* 50, 883-890.
- Griffith, C., Dasvidon, C.A., Peters, A.C. y Fielding, L.M. 1997. Towards a strategic cleaning assessment programme: hygiene monitoring and ATP luminometry, an options appraisal. *Food Science and Technology Today* 11, 15-24.
- Griffith, C., Cooper, R., Gilmore, J., Davis, C. y Lewis, M. 2000. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. *Journal of Hospital Infection* 45, 19-28.

- Griffiths, M.W. 1997. Rapid Microbiological methods with Hazard Analysis Critical Control Points. *Journal of AOAC International* 80, 1143-1150.
- Grönholm, L., Wirtanen, G., Ahlgren, K., Nordström, K. y Sjöberg, A. 1999a. Anti-microbial activities of disinfectants and cleaning agents against food spoilage microbes in the food and brewery industries. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung A* 208, 289-298.
- Herald, P.J. y Zottola, E.A. 1988. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. *Journal of Food Protection* 51, 445-448.
- Herman, B. 1998. *Fluorescence microscopy*. Springer-Verlag, New York.
- Herrador F .2001. Puesta a punto de protocolos normalizados para verificar la eficacia bactericida de sustancias desinfectantes. *Departament Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona*.
- Herruzo, R. 2000. Desinfectantes españoles para el siglo XXI. *Anuales de la Real Academia Nacional de Medicina*, 791-806.
- Hirai, Y. 1991. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection* 19, 191-200.
- Holah, J.T., Betts, R.P. y Thorpe, R.H. 1988. The use of direct epifluorescence microscopy (DEM) and the direct epifluorescence filter technique (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. *Journal of Applied and Bacteriology* 65, 215-221.
- Holah, J.T. y Thorpe, R.H. 1990. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Microbiology* 69, 599-608.
- Holah, J. T. 1992. Industrial monitoring: Hygiene in food processing. In *Biofilms-science and technology* ed. Melo, L.F. pp. 645-659.
- Holah, J.T. 1995a. Disinfection of food production areas. *International Office of Epizootics* 14, 343-363.
- Holah, J.T. 1995b. Progress report on CEN/TC 216/Working group 3: Disinfectant Test Methods for food hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *International Biodeterioration and Biodegradation* 355-365.
- Holah, J.T., Lavaud, A., Peters, W. y Dye, K.A. 1998. Future techniques for disinfectant efficacy testing. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41, 273-279.
- Hood, S.K. y Zottola, E.A. 1997. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. *Journal of Food Protection* 60, 1034-1037.
- Humphrey, T.J., Martin, K.W. y Whitehead, A. 1994. Contamination of hands and worksurfaces with *Salmonella enteritidis* PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiology and Infection* 113, 403-409.

Humphrey, T., Mason, M. y Martin, K. 1995. The isolation of *Campylobacter jejuni* from contaminated surfaces and its survival in diluents. *International Journal of Food Microbiology* 26, 295-303.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1988. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). System to ensure Microbiological Safety and Quality. In *Microorganisms in Food* Oxford: Blackwell Scientific Publications.

ICMSF 1996. *Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos* 2. Zaragoza: Acribia.

Jeffrey, D.J. 1995. Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives. *International Office of Epizootics* 14, 57-74.

Kahrs, R.F. 1995. General disinfection guidelines. *International Office of Epizootics* 14, 105-122.

Krysinski, E.P., Brown, L.J. y Marchisello, T.J. 1992. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached product contact surfaces. *Journal of Food Protection* 55, 246-251.

Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C. y Beumer, R.R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology* 85, 227-236.

La Duc, M.T., Kern, R. y Venkateswaran, K. 2003. Microbial Monitoring of Spacecraft and Associated Environments. *Microbial Ecology* 47, 150-158.

Langsrud, S., Sidhu, M.S., Heir, E. y Holck, A.L. 2003. Bacterial disinfectant resistance--a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51, 283-290.

Letellier, A., Messier, S. y Quessy, S. 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. *Journal of Food Protection* 62, 22-25.

Lopez-Amoros, R., Comas, J. y Vives-Rego, J. 1995. Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2521-2526.

Lunden, J., Autio, T., Markkula, A., Hellstrom, S. y Korkeala, H. 2003. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* 82, 265-272.

Mah, T.F. y O'toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 9, 34-39.

Maris, P. 1995. Modes of action of disinfectants. *International Office of Epizootics*, 47-55.

- Mathew, F.P. y Ryser, E.T. 2002. Competition of thermally injured *Listeria monocytogenes* with a mesophilic lactic acid starter culture in milk for various heat treatments. *Journal of Food Protection* 65, 643-650.
- Mattila-Sandholm, T., Manninen, M. y Kylasiurola, A.L. 1990. Effect of cleaning-in-place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. *Journal of Dairy Research* 57, 33-39.
- Mattila-Sandholm, T. y Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in industry: a review. *Food Reviews International* 8, 573-603.
- Maukonen, J., Mattila-Sandholm, T. y Wirtanen, G. 2000. Metabolic Indicators for assessing bacterial viability in hygiene sampling using cells in suspension and swabbed biofilm. *Food Science and Technology*. 33, 225-233.
- Maukonen, J., Matto, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., Salo, S. y Saarela, M. 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 327-356.
- McDonell, G. y Rusell, D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 147-179.
- McEldowney, S. y Fletcher, M. 1988. The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology* 7, 83-86.
- McEvoy, J.M., Doherty, A.M., Sheridan, J.J., Blair, I.S. y McDowell, D.A. 2001. Use of steam condensing at subatmospheric pressures to reduce *Escherichia coli* O157:H7 numbers on bovine hide. *Journal of Food Protection* 64, 1660.
- McFeters, G. A. 1990. Enumeration, occurrence and significance of injured indicator bacteria in drinking water. In *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments* ed. McFeters, G.A.
- McFeters, G.A., Yu, F.P., Pyle, B.H. y Stewart, P.S. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *Journal of Microbiological Methods* 21, 1-13.
- Michaels, B., Ayers, T. y Celis, M. 2002. Inactivation of refrigerator biofilm bacteria for application in the food service environment. *Journal Food Protection* 65, 50-150.
- Midelet, G. y Carpentier, B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied And Environmental Microbiology* 68, 4015-4024.
- Mies, P.D., Covington, B.R., Harris, K.B., Lucia, L.M., Acuff, G.R. y Savell, J.W. 2004. Decontamination of cattle hides prior to slaughter using washes with and without antimicrobial agents. *Journal of Food Protection* 67, 582-587.
- Miettinen, H., Aarnisalo, K., Salo, S. y Sjöberg, A. 2001. Evaluation of Surface Contamination and the Presence of *Listeria monocytogenes* in Fish Processing Factories. *Journal of Food Protection* 64, 635-639.

- Mittelman, M.W. 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science* 81, 2760-2764.
- Montville, R., Chen, Y. y Schaffner, D.W. 2002. Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data. *International Journal of Food Microbiology* 73, 305-313.
- Moore, G., Griffith, C. y Fielding, L.M. 2001. A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: a laboratory study. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 21, 478-488.
- Moore, G. y Griffith, C. 2002a. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiology* 19, 65-73.
- Moore, G. y Griffith, C. 2002b. Factors influencing recovery of microorganisms from surfaces by use of traditional hygiene swabbing. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 22, 410-421.
- Moretro, T., Hermansen, L., Holck, A.L., Sidhu, M.S., Rudi, K. y Langsrud, S. 2003. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5648-5655.
- Mossel, D., Corry, J., Struijk, C. and Baird, R. 1995. *Essentials Of The Microbiology Of Foods*. Belfast: John Willey & Sons LTD.
- Mosteller, T.M. y Bishop, J.R. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of Food Protection* 56, 34-41.
- Orihuel, E. y Berto, R. 1996. Evaluación de la desinfección de superficies en una industria cárnica por la técnica de inoculación por contacto. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 7, 49-54.
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R. y Gilmour, A. 1995. Effect of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in Phosphate-Buffered Saline and Foods. *Journal of Food Protection* 58, 524-529.
- Pecorelli, S., Rosmini, M.R., Cabrera, A., Moreyra, E. y Otero, J. 1993. Comparación de tres procedimientos de muestreos para el análisis microbiológico de superficies. *Fleischwirtschaft. español* 1, 38.
- Peng, J.S., Tsai, W.C. y Chou, C.C. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 65, 105-111.
- Pontefract, R.D. 1991. Bacterial adherence - Its consequences in food-processing. *Canadian Institute of Food Science and Technology* 24, 113-117.
- Potts, M. 2001. Desiccation tolerance: a simple process? *TRENDS in Microbiology* 9, 553-559.
- Puig-Durán, J., Bota, E. y Sancho, J. 1996. Evaluación de desinfectantes en condiciones de uso real en la industria cárnica. *Cárnica 2000*, 44-48.

- Reed, C.A. 1996. Foodborne illness prevention before slaughter? Yes! *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208.
- Reid, C.A., Avery, S.M., Hutchison, M.L. y Buncic, S. 2002. Evaluation of sampling methods to assess the microbiological status of cattle hides. *Food Control* 13, 405-410.
- Reij, M.W. y Den Aantrekker, E.D. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology* 91, 1-11.
- Rigsbee, W., Simpson, L.M. y Oliver, J.D. 1996. Detection of the viable but nonculturable state in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Safety* 1, 255-262.
- Robine, E., Boulangé-Petermann, L. y Derangère, D. 2002. Assessing bactericidal properties of materials: the case of metallic surfaces in contact with air. *Journal of Microbiological Methods* 49, 225-234.
- Rodrigues, L.C., Cowden, J.M., Wheeler, J.G., Sethi, D., Wall, P.G., Cumberland, P., Tompkins, D.S., Hudson, M.J., Roberts, J.A. y Roderick, P.J. 2001. The study of infectious intestinal disease in England: risk factors for cases of infectious intestinal disease with *Campylobacter jejuni* infection. *Epidemiology and Infection* 127, 185-193.
- Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. y Ridgway, H.F. 1992. Use of A Fluorescent Redox Probe for Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1801-1808.
- Rose, L.J., Donlan, R., Banerjee, S.N. y Arduino, M.J. 2003. Survival of *Yersinia pestis* on Environmental Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2166-2171.
- Rossoni, E.M.M. y Gaylarde, C.C. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology* 61, 81-85.
- Russell, A. D. and Chopra, I. 1996. *Understandig Antibacterial action and Resistance*. United Kingdom: Ellis Horwood, Chichester.
- Russell, S.M. 2000. Comparison of the Traditional Three-Tube Most Probable Number Method with the Petrifilm, SimPlate, BioSys Optical, and Bactometer Conductance Methods for Enumerating *Escherichia coli* from Chicken Carcasses and Ground Beef. *Journal of Food Protection* 63, 1179-1183.
- Salo, S., Alanko, T., Sjoberg, A.M. y Wirtanen, G. 2002. Validation of the Hygicult (R) E dipslides method in surface hygiene control: A Nordic collaborative study. *Journal of Aoac International* 85, 388-394.
- Servis, N.A., Nichols, S. y Adams, J.C. 1995. Development of a direct viable count procedure for some gra-positive bacteria. *Letters ans Applied Microbiology* 20, 237-239.
- Sharma, M. y Anand, S.K. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - a case. *Food Control* 13, 469-477.
- Silley, P. y Forsythe, S. 1996. Impedance Microbiology-a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology* 80, 233-243.

- Socias, A. 1992. La higiene en la industria cárnica. *Eurocarne*, 15-16.
- Sofos, J.N. y Smith, G.C. 1998. Nonacid meat decontamination technologies: Model studies and commercial applications. *International Journal of Food Microbiology* 44, 171-188.
- Sofos, J.N., Kochevar, S.I., Bellinger, G.R., Buege, D.R., Hancock, D.D., Ingham, S.C., Morgan, J.B., Reagan, J.O. y Smith, G.C. 1999. Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughtering plants. *Journal of Food Protection* 62, 140-145.
- Sofos, J.N. 2002. Approaches to pre-harvest food safety assurance. In *Food Safety Assurance and Veterinary Public Health* ed. Smulders F.J. y Collins J.D.
- Stevens, R.A. y Holah, J.T. 1993. The effect of wiping and spray-wash temperature on bacterial retention on abraded domestic sink surfaces. *Journal Applied Bacteriology* 75, 91-94.
- Stone, L.S. y Zottola, E.A. 1985. Scanning electron microscopy study of stainless-steel finishes used in food processing equipment. *Food Technology* 39, 110-114.
- Stopforth, J.D., Samelis, J., Sofos, J.N., Dendall, P.A. y Smith, G.C. 2002. Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. *Journal of Food Protection* 65, 1717-1727.
- Sundheim, G., Hagtvedt, T. y Dainty, R. 1992. Resistance of meat associated staphylococci to a quarternary ammonium compound. *Food Microbiology* 9, 161-167.
- Takeuchi, K. y Frank, J.F. 2001. Confocal microscopy and microbial viability detection for food research. *Journal of Food Protection* 64, 2088-2102.
- Tamblyn, K.C. y Conner, D.E. 1997. Bactericidal activity of organic acids against *Salmonella typhimurium* attached to broiler skin. *Journal of Food Protection* 60, 629-633.
- Taormina, P.J. y Beuchat, L.R. 2001. Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Applied Environmental Microbiology* 67, 2555-2563.
- Taylor, J.H., Rogers, S.J. y Holah, J.T. 1999. A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 87, 718-725.
- Tebbutt, G.M. 1991. An assessment of cleaning and sampling methods for food-contact surfaces in premises preparing and selling highrisk foods. *Epidemiology and Infection* 106, 319-327.
- Troller JA .1993. *Sanitation in food processing*. Academic Press, Inc. San Diego. 478.
- Valcárcel, S., Escudero, J.M. y Marco, J.M. 2002. Estudio comparativo de varios métodos de valoración de la contaminación en superficies, respecto a las técnicas microbiológicas de referencia. *Alimentaria* 335, 55-62.

- Van Klingeren, B. 1995. Disinfectant testing on surfaces. *Journal of Hospital Infection* 30, 397-408.
- Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S. y Sjoberg, A.M. 1996. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control* 7, 263-276.
- Velazquez, M. y Feirtag, J.M. 1997. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers and sanitizers on the detection of ATP bioluminescence signal. *Journal of Food Protection* 60, 799-803.
- Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, M.T. y Kern, R. 2003. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *Journal of Microbiological Methods* 52, 367-377.
- WHO (World Health Organisation) .1995. *Surveillance Programme.Sixth Report of WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe.*
- Wildbrett, G. 2000. *La limpieza y desinfección en la industria alimentaria.* Zaragoza: Acribia.
- Williams, S.C., Hong, Y., Danavall, D.C.A., Howard-Jones, M.H., Gibson, D., Frischer, M.E. y Verity, P.G. 1998. Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *Journal of Microbiological Methods* 32, 225-236.
- Wirtanen, G., Aalto, M., Härkönen, P., Gilbert, P. y Mattila-Sandholm, T. 2001a. Efficacy testing of commercial disinfectants against foodborne pathogenic and spoilage microbes in biofilm-constructs. *European Food Research and Technology* 213, 409-414.
- Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I.M. y Mattila-Sandholm, T. 2001b. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 20, 37-50.
- Wirtanen, G. y Salo, S. 2003. Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2, 293-306.
- Yu, F.P. y McFeters, G.A. 1994. Rapid in situ assessment of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescent probes. *Journal of Microbiological Methods* 20, 1-10.
- Zottola, E.A. y Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry-should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology* 23, 125-148.